

Académie de Montpellier
Université de Montpellier II
Sciences et techniques du Languedoc

Thèse

présentée à l'université des sciences et techniques du Languedoc pour obtenir
le diplôme de doctorat

spécialité: biologie et physiologie des organismes et des populations

Analyse génétique et physiologique des interactions hôte-parasite:

le système *prosorhynchus squamatus* - *Mytilus*.

par
Christine Coustau

Soutenue le 14 février 1991 devant le jury composé de:

MM. Thaler L. président et rapporteur
Jourdan J. rapporteur
Combes C.
Delay B.
Devauchelle A.
Hewitt G.
Mathieu M.
Raibaut A.

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
--- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC ---

THESE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc pour obtenir
le diplôme de DOCTORAT
Spécialité: Biologie et physiologie des organismes et des populations

**ANALYSE GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES
INTERACTIONS HOTE-PARASITE:
le système *Prosohynchus squamatus* - *Mytilus*.**

par

Christine COUSTAU

Soutenu le 14 Février 1991 devant le jury composé de:

- MM. THALER L. Président et rapporteur
- JOURDANE J. Rapporteur
- COMBES C.
- DELAY B.
- DEVAUCHELLE A.
- HEWITT G.
- MATHIEU M.
- RAIBAUT A.



Le travail présenté ici est la concrétisation d'une étroite collaboration entre l'Institut des Sciences de l'Evolution dirigé par le Professeur L. THALER et le laboratoire de Parasitologie Comparée dirigé par le Professeur L. EUZET, puis le Professeur A. RAIBAUT.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur EUZET qui m'a accueillie dans son laboratoire lors de mon D.E.A., et durant les trois années de thèse qui ont suivi. Chacune des discussions que nous avons eues fut pour moi l'occasion de saisir un peu de vos connaissances encyclopédiques et de votre passion pour la parasitologie et la biologie en général. Vous êtes, Monsieur, un "personnage" que je suis heureuse d'avoir cotoyé.

Cette thèse n'aurait jamais pu se réaliser sans la confiance que Monsieur THALER m'a accordée en m'accueillant dans sa formation doctorale. Vous m'avez donné les moyens d'évoluer dans un environnement scientifique pluridisciplinaire et vous avez manifesté, tout au long de ces trois années, un intérêt constant à l'égard de mon travail. Je vous en suis très reconnaissante. Merci également d'avoir accepté de juger ce travail, et d'en être rapporteur.

L'occasion m'est donnée ici d'exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur J. JOURDANE pour l'aide précieuse qu'il m'a spontanément apportée dans le déroulement de mes recherches. Je peux, grâce à vous, franchir une étape décisive dans la carrière d'un jeune chercheur: celle de la recherche post-doctorale dans un laboratoire étranger. Pour cela, et pour avoir accepté d'être rapporteur, soyez assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur C. COMBES pour son soutien et sa contribution à "l'exportation" et la publication de mes tous premiers résultats. Ce fut pour moi le meilleur des encouragements. Votre présence parmi les membres du jury me fait un réel plaisir.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur A. RAIBAUT pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail depuis son arrivée au Laboratoire de Parasitologie Comparée, et pour sa présence parmi les membres du jury.

Au cours de ces trois années de recherche, j'ai eu l'occasion de rencontrer Messieurs A. DEVAUCHELLE (Directeur de la Station INRA de St Christol les Ales) et G. HEWITT (Professeur à l'Université de Norwich). Ils ont tous deux pris le temps de m'écouter, de répondre à mes questions, et de me conseiller avec une extrême gentillesse. Je suis aujourd'hui très honorée de leur présence dans ce jury.

C'est à M. MATHIEU, de l'Université de Caen, que je dois le privilège de m'être lancée dans l'étude des interactions physiologiques entre hôte et parasite. Il m'a fait bénéficier de sa compétence et son expérience dans le domaine de la physiologie et l'endocrinologie des bivalves. Grâce à lui, les quelques expériences réalisées "par curiosité mutuelle" la première année ont donné lieu à une véritable collaboration entre nos laboratoires. Merci de t'être intéressé aux parasites, et de témoigner une fois de plus l'intérêt que tu portes à mon travail en participant à ce jury de thèse.

Grâce à B. DELAY (D.R. CNRS à l'Institut des Sciences de l'évolution) et F. RENAUD (C.R. CNRS au Laboratoire de Parasitologie comparée), j'ai pu bénéficier des avantages d'une véritable codirection. Donner toutes les raisons que j'ai de vous remercier prendrait des pages, alors au risque de tomber dans l'excès inverse, je vous dirai simplement mais sincèrement "Un grand merci à tous les deux".

Claude MAILLARD ne peut malheureusement pas lire ces lignes. Il fut à l'origine de ces recherches en dirigeant mon travail de DEA, et me témoigna sa confiance en acceptant ensuite de diriger ma thèse. Hélas, le travail a dû se poursuivre sans lui mais je tiens à exprimer ici toute ma reconnaissance pour le rôle déterminant qu'il a joué.

Que Madame N. Pasteur soit assurée de ma sincère gratitude pour l'aide et le soutien qu'elle m'a apportés en de nombreuses occasions, au cours de ces trois années de thèse.

Je suis très reconnaissante envers Monsieur le Professeur P. LUBET qui m'a accueillie chaque année dans son laboratoire de Zoologie de Caen, et m'a donné les moyens de travailler dans d'excellentes conditions. Je remercie chaleureusement Ian ROBBINS et Frédérique LENOIR pour leur disponibilité, leur aide précieuse dans l'apprentissage des expérimentations in vitro, et leurs conseils avisés. Ils ont contribué,

avec Jean-Yves TOULLEC, Jacques LEBRETON et Jeanne MATHIEU à rendre mes séjours "dans le Grand Nord" à la fois enrichissants et agréables.

J'ai bénéficié, pour les missions de terrain, et les expérimentations en milieu naturel et en bassins, de la collaboration de Dominique BLATEAU, rendue possible grâce à Messieurs de KERGARIOU et MAZURIE directeurs de la Station IFREMER de La Trinité/Mer. Cette collaboration fut particulièrement déterminante dans le déroulement de mes recherches. Je vous remercie du soutien que vous m'avez apporté.

Je souhaite remercier Messieurs HURTAUD et FRIOUX pour leur coopération salvatrice et la gentillesse avec laquelle ils m'ont respectivement offert du matériel vivant et permis d'utiliser leurs installations mytilicoles pour mes expérimentations.

Merci à Nathalie Magnan pour la confiance qu'elle m'a témoigné en effectuant son stage annexe de DEA sous ma direction et pour le sérieux de son travail.

Je tiens à remercier tous les membres de l'Institut des Sciences de l'Evolution pour les nombreux échanges de vue toujours sympathiques que nous avons eus.

Je remercie en particulier Eric MATHIEU et Michel RAYMOND pour avoir élaboré des programmes de tirage aléatoire adaptés à mes données. Merci également à Patrick BERREBI, François BONHOMME, Philippe BORSA et François CATZEFLIS pour les services qu'ils m'ont rendus en diverses occasions.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux aux membres du Laboratoire de Parasitologie Comparée pour leur soutien moral et matériel. J'ai été sensible aux conseils et encouragements de Claude GABRION, et à la sympathie qu'Emile BIRGI, Alain LAMBERT et Patrick SILAN m'ont témoignés. Brigitte DANIEL et Michèle BOISSEAU ont toujours répondu à mes appels et m'ont offert leurs services lorsque je me débattais dans les tâches administratives ou de secrétariat. Un grand merci à mes collègues et amis, qui ont partagé la vie quotidienne du laboratoire, Ouafae BERRADA, Jean-François GUEGUAN, Thierry de MEEUS, Régine LEDUCQ, Catherine MOULIA, Antoine PARISELLE et Jerome REVERSAT. Merci encore à ceux que je n'ai pas cités (permanents et étudiants) et qui ont également contribué à rendre ces quatre années distrayantes, mouvementées et particulièrement enrichissantes.

Un grand merci enfin à mes parents et à mes amis pour m'avoir toujours encouragée, et pour le réconfort qu'ils m'ont apporté dans les moments critiques.

* * *

Ce travail, financé par l'Institut des Sciences de l'Evolution (UA 327 du C.N.R.S) et le Laboratoire de Parasitologie comparée (UA 698 du C.N.R.S) a reçu un soutien financier de la part:

- Du ministère de la recherche et de la technologie, sous forme d'allocation de recherche,
- Du conseil général de l'Hérault: contrat CEREMER, N229,
- De l'IFREMER: contrat universitaire 902524001.

AVANT PROPOS

La biologie a pour objet de caractériser et comprendre la diversité et l'organisation du monde vivant. Chaque niveau de complexité (molécules, cellules, organes, organismes, populations, espèces, peuplements et écosystèmes) donne lieu à plusieurs sciences précises. Cette compartimentation permet d'étudier des mécanismes de plus en plus pointus dans un domaine donné de la biologie.

Le "monde des biologistes" tout comme le monde des êtres vivants est donc polymorphe et structuré. Cependant, les interactions entre unités de travail ne peuvent matériellement pas être aussi importantes que les interactions entre les niveaux d'organisation du monde vivant.

Ainsi, à l'heure où certains biologistes s'intéressent aux stratégies "spécialiste ou généraliste" des êtres vivants, nous pouvons nous interroger sur les stratégies "spécialiste ou généraliste" des biologistes.

J'ai personnellement adopté, pour ce travail, une stratégie "généraliste"!

En effet, l'analyse du système hôte-parasite présentée ici, débute par l'étude des interactions entre populations naturelles, à l'échelle des côtes atlantiques françaises, et se termine par l'étude d'interactions entre molécules et cellules dans un tube stérile.

Quel que soit le sort que réservent la sélection "naturelle" et le hasard à cette stratégie, je tiens à témoigner de l'immense plaisir que j'ai eu à aborder ces quelques niveaux de l'organisation du monde vivant.

SOMMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

PRESENTATION DU MODELE ETUDIE

I Le complexe hôte.....	7
1) Biologie du genre <i>Mytilus</i>	7
2) Le complexe <i>M. edulis/galloprovincialis</i>	7
3) Caractérisation des individus hôtes.....	10
II Le trématode: <i>Prosorhynchus squamatus</i>	10
III Le système hôte-parasite.....	17

Chapitre I: CARACTERISATION DE L'HYBRIDATION ENTRE *MYTILUS EDULIS* ET *M. GALLOPROVINCIALIS* SUR LES COTES ATLANTIQUES FRANCAISES

INTRODUCTION.....	21
MATERIEL ET METHODES	
1) prélèvements.....	23
2) Analyse du polymorphisme enzymatique.....	24
3) Traitement des données.....	24
RESULTATS	
1) Différenciation génétique entre échantillons.....	25
2) Variabilité génétique intra-échantillon.....	28
DISCUSSION.....	30

Chapitre II: SPECIFICITE DE *P. SQUAMATUS* AU SEIN DU COMPLEXE *MYTILUS EDULIS* / *GALLOPROVINCIALIS*.

INTRODUCTION.....	37
MATERIEL ET METHODES	
1) Protocole expérimental.....	38

2) Caractérisation génotypique des mollusques.....	40
3) Traitement des données.....	40
RESULTATS	
1) Variabilité génétique inter- et intra-échantillons.....	42
2) Caractérisation des génotypes infestés.....	42
DISCUSSION.....	44

Chapitre III: STRUCTURE DES ASSOCIATIONS PARASITE / GENOTYPE HOTE AU SEIN D'UNE POPULATION DE *MYTILUS EDULIS*.

INTRODUCTION.....	49
MATERIEL ET METHODES	
1) Prélèvements.....	50
2) Analyse du polymorphisme enzymatique.....	50
3) Traitement des données.....	51
RESULTATS	
1) Relation entre présence du trématode et présence d'une allèle particulier.....	53
2) Relation entre parasitisme et combinaison allélique.....	53
3) Relation entre présence du parasite et hétérozygotie multilocus.....	57
DISCUSSION.....	58

Chapitre IV: ANALYSE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA CASTRATION PARASITAIRE

INTRODUCTION.....	63
MATERIEL ET METHODES	
1) Animaux.....	64
2) Bioessais.....	66
3) Préparation des extraits.....	68
RESULTATS	
1) Effet sur les mitoses goniales.....	69
2) Action sur la mobilisation du glycogène.....	72
DISCUSSION.....	73

**Chapitre V: DEBUT DE CARACTERISATION DES PROPRIETES
BIOLOGIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES FACTEURS INHIBITEURS
DES MITOSES**

INTRODUCTION.....	81
MATERIEL ET METHODES	
1) Animaux.....	82
2) suspensions cellulaires.....	82
3) Bioessais.....	82
4) Préparation des extraits.....	83
RESULTATS	
1) Specificité de l'effet biologique des F.I.M.h et F.I.M.p.....	84
2) Approche des propriétés physico-chimiques des F.I.M.h et F.I.M.p.....	86
DISCUSSION.....	89
CONCLUSION GENERALE.....	97
BIBLIOGRAPHIE GENERALE.....	111
ANNEXES.....	125

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

* Parmi les processus évolutifs responsables de la diversité et de l'organisation du monde vivant, les mécanismes liés au parasitisme offrent un intérêt particulier. En effet, non seulement le parasitisme concerne tous les êtres vivants, soit en tant qu'hôtes, soit en tant que parasites (Price 1980), mais il est source de pressions sélectives pour chacun des deux partenaires. Dans cette association hétérospécifique asymétrique l'hôte qui peut tout à fait vivre sans parasite, constitue la principale source de pression sélective du parasite puisqu'il représente son système habitat-ressource.

Par ailleurs, le parasite qui ne peut vivre sans hôte constitue par définition l'un des facteurs sélectifs de l'individu hôte, puisqu'il se développe à ses dépens (Price 1980).

Toutefois, pour que le parasite puisse exercer une pression de sélection sur les populations ou espèces hôtes, il faut, bien entendu, qu'il diminue la valeur sélective (fécondité-viabilité) des individus infestés, mais aussi que (Boulétreau 1986):

1 - Les populations ou espèces hôtes présentent une variabilité des caractères associés au parasitisme.

2 - Cette variabilité ait un déterminisme génétique.

L'image que nous percevons d'un système hôte-parasite est une image ponctuelle correspondant à un temps "t" de l'évolution du système considéré. Cependant, seules la caractérisation et la compréhension de cette image peuvent nous permettre d'envisager l'histoire évolutive de la relation.

Afin d'obtenir la "meilleure image possible", nous étudions dans ce travail les relations existant au sein d'un seul système hôte-parasite, mais à différents niveaux d'interaction: au niveau des espèces et populations, ainsi qu'au niveau des organismes.

L'ensemble des phénomènes et des thèmes abordés au cours de ces différentes approches sont liés entre eux par une seule et même question, fondamentale dans l'étude des relations hôte-parasite (Combes 1988).

Quelles sont les cibles atteintes par le parasite?

* Notre modèle biologique est constitué par le trématode *Prosorhynchus squamatus* Odhner, 1905, et les bivalves *Mytilus edulis* L./ *M. galloprovincialis* Lmk.

Le choix de ce matériel fut tout d'abord motivé par un intérêt appliqué. En effet, de fortes mortalités étaient signalées en 1986 au sein d'élevages de moules en Bretagne et Normandie. L'agent pathogène responsable était alors inconnu, mais l'examen de ces mollusques nous a permis d'identifier *P. squamatus*, un trématode peu étudié. Nos premiers travaux, réalisés à la demande des mytiliculteurs et en collaboration avec l'IFREMER, ont rapidement mis en évidence l'intérêt que présente ce modèle en recherche fondamentale.

L'examen de moules prélevées en Bretagne au sein de populations naturelles a révélé une grande diversité des caractères morphologiques. Nous observons effectivement, en fonction des localités, des formes typiquement *M. edulis*, typiquement *M. galloprovincialis*, ainsi que de nombreuses formes intermédiaires. Cette forte variabilité observée en milieu naturel est particulièrement propice à l'étude des relations hôte-parasite, et permet une approche en population naturelle des mécanismes évolutifs (à l'échelle de la micro évolution) liés au parasitisme.

En effet, ces processus peuvent être abordés de deux façons différentes:

- Soit, en laboratoire, par l'étude de l'évolution de la structure génétique des populations hôtes, au cours des générations soumises au parasitisme (Takahashi et Pimentel 1967; Barrett 1983; Boulétreau 1986)

- Soit, en milieu naturel, par l'analyse des relations existant entre parasitisme, et variabilité des populations hôte (Price 1980; Holmes 1983).

La plupart des systèmes hôte-parasite ne peuvent être étudiés que selon la seconde approche. Dans ce cas, les zones d'hybridation ou les "sites d'hybridation" constituent de véritables laboratoires naturels (Hewitt 1988) puisque le parasite peut être confronté, dans un même environnement, à un ensemble d'hôtes potentiels génétiquement différents.

La première étape, dans l'étude de ce modèle, est donc de caractériser l'hybridation entre les taxons hôtes, et d'analyser la variabilité génétique au sein des populations.

Nous rechercherons ensuite, les relations entre parasitisme et caractéristiques génétiques hôtes.

Enfin, sachant que ce trématode peut avoir un impact sur les populations hôtes puisqu'il induit la castration et parfois la mort des individus hôtes, nous analyserons les relations hôte-parasite à l'échelle individuelle. Nous étudierons le

mode d'action pathogène, et en particulier, les mécanismes impliqués dans la castration parasitaire.

Les travaux que nous exposons au cours des différents chapitres suivent ce fil conducteur et ont pour but de :

1 - Caractériser le complexe *M. edulis*/*M. galloprovincialis* sur les côtes atlantiques françaises, afin de connaître l'ensemble des cibles potentielles du trématode.

2 - Analyser les caractéristiques génétiques des cibles atteintes au sein des populations hôtes.

3 - Identifier les cibles atteintes au sein de l'organisme hôte.

Le degré de spécialisation du parasite au sein de l'individu hôte et du (des) taxon(s) hôte(s) nous permettra de discuter, d'une part, de l'histoire évolutive du système hôte-parasite, et d'autre part, de l'influence éventuelle du parasite sur l'évolution des populations hôtes.

* * *

* Les résultats exposés dans "Présentation du matériel" sont issus d'une note parue dans *Pathology in Marine Science*, T.C. Cheng & F.O. Perkins eds., (Coustau *et al.* 1990).

* Les résultats présentés dans le premier chapitre ont donné lieu à un article soumis à *Marine Biology*.

* Le chapitre II correspond à un article publié dans *Genetical Research* (Coustau *et al.* ss presse a).

* Le chapitre IV correspond à un article accepté pour publication dans *Experimental Parasitology* (Coustau *et al.*, ss presse b).

PRESENTATION DU MODELE ETUDIE

PRESENTATION DU MODELE ETUDIE

I LE COMPLEXE HOTE:

1) Biologie du genre *Mytilus*:

Les mollusques du genre *Mytilus* sont des bivalves marins à vie sédentaire. Les espèces sont gonochoriques et présentent un cycle de reproduction annuel alternant avec une phase de repos sexuel durant laquelle des réserves nutritionnelles sont constituées (Bayne 1976, Lubet 1976). Les moules ne possèdent pas de gonades différenciées, mais des tubules gonadiques ramifiés se développant au sein des tissus du manteau et de la masse viscérale. Il s'agit d'espèces particulièrement fécondes puisque l'on sait, par exemple, que les femelles de *M. edulis* libèrent environs 25 millions d'oeufs par saison de reproduction (Field 1922). La fécondation se produit dans l'eau et les larves planctoniques se fixent au bout de trois à sept semaines (Bayne 1976).

Cette longue phase planctonique devrait donc permettre aux larves de parcourir de longues distances.

Le nombre d'espèces appartenant au genre *Mytilus* fut l'objet de nombreuses controverses (Bayne 1976). En effet, il existe parfois des formes intermédiaires entre "espèces", et l'exemple le plus connu est celui du complexe *M. edulis/galloprovincialis* présent sur les côtes européennes.

2) Le complexe *M. edulis/galloprovincialis*:

Mytilus galloprovincialis se serait différencié de *M. edulis* en Méditerranée durant les dernières glaciations du pléistocène (Barsotti et Meluzzi 1968). La présence de *M. galloprovincialis* sur les côtes atlantiques françaises serait due à une extension de son aire de distribution conduisant à un contact secondaire avec *M. edulis* (Fig. 1).

Des différences entre ces deux taxons ont été mises en évidence au cours d'études morphologiques (Lewis et Seed 1969; Seed 1972; Lubet 1973)(Fig. 2), caryologiques (Thiriot-Quiévreux 1984), immunologiques (Bisignano *et al.* 1980), ainsi que par l'analyse de l'ADN mitochondrial (Edwards et Skibinski 1987). L'analyse du polymorphisme enzymatique montre également de fortes différences dans les fréquences alléliques de plusieurs locus (Gosling 1984; Beaumont *et al.* 1989). Il est cependant difficile d'attribuer un statut taxinomique à *M. galloprovincialis* puisque son

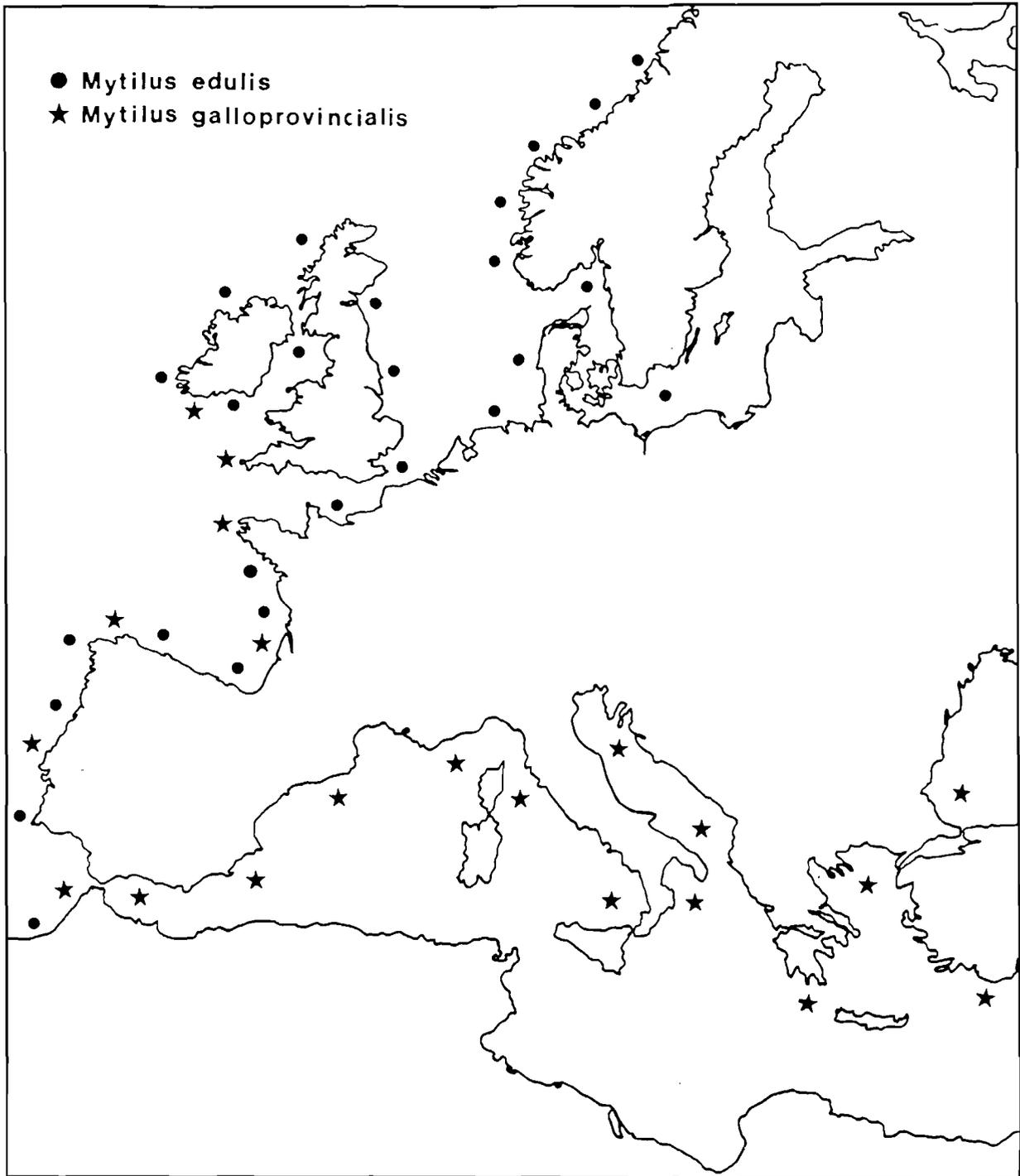


Figure 1: Aires de répartition de *M. edulis* (●) et *M. galloprovincialis* (★) sur les côtes européennes.

hybridation avec *M. edulis* se produit en milieu naturel (Skibinski *et al* 1978), et fut vérifiée expérimentalement (Lubet *et al.* 1984).

Les principaux résultats connus sur l'hybridation naturelle entre ces deux formes sont exposés dans le chapitre I.

3) Caractérisation des individus hôtes:

La principale difficulté rencontrée lorsque l'on étudie le complexe *M. edulis/galloprovincialis* vient du fait qu'il n'existe pas de caractères diagnostiques de l'une ou l'autre des deux formes (Gosling 1984; Beaumont *et al.* 1989). Les deux techniques utilisées pour différencier ces formes sont l'analyse des caractères morphologiques et l'analyse du polymorphisme enzymatique. Cependant, l'estimation des caractères morphologiques est parfois subjective (ex: couleur du bord du manteau variant du noir chez *galloprovincialis* au brun chez *edulis*). De plus ces caractères présentent une forte plasticité (Seed 1968).

Nous avons donc choisi d'utiliser l'électrophorèse des isoenzymes pour caractériser les individus du complexe hôte (annexe 1). Cette méthodologie nous a permis de caractériser la structure génétique des populations de *Mytilus* des côtes atlantiques françaises.

II LE TREMATODE *Prosorhynchus squamatus*:

Les trématodes sont des helminthes parasites à cycle hétéroxène. Le cycle typique d'un trématode fait intervenir deux hôtes intermédiaires et un hôte définitif (Fig. 3).

L'identité des trématodes est parfois difficile à établir car les stades larvaires (sporocystes et cercaires) sont morphologiquement très différents des stades métacercaires (préadultes) et adultes. Ainsi, de nombreux trématodes ont été décrits sous un certain nom chez le premier hôte intermédiaire, et sous un nom différent chez l'hôte définitif. La meilleure façon d'établir l'identité d'un trématode est de réaliser son cycle expérimentalement et de confronter les descriptions de ses différents stades de développement. Cependant, le cycle n'est pas toujours réalisable entièrement. Ainsi, personne n'a pu infester expérimentalement un mollusque par une larve de *Bucephalidae* (Famille à laquelle appartient *P. squamatus*) (Maillard com. pers.).

Chubrik (1952) réalise en partie le cycle de *P. squamatus* et Matthews (1972) se base sur les descriptions de Chubrik pour réviser en détail la description de la cercaire

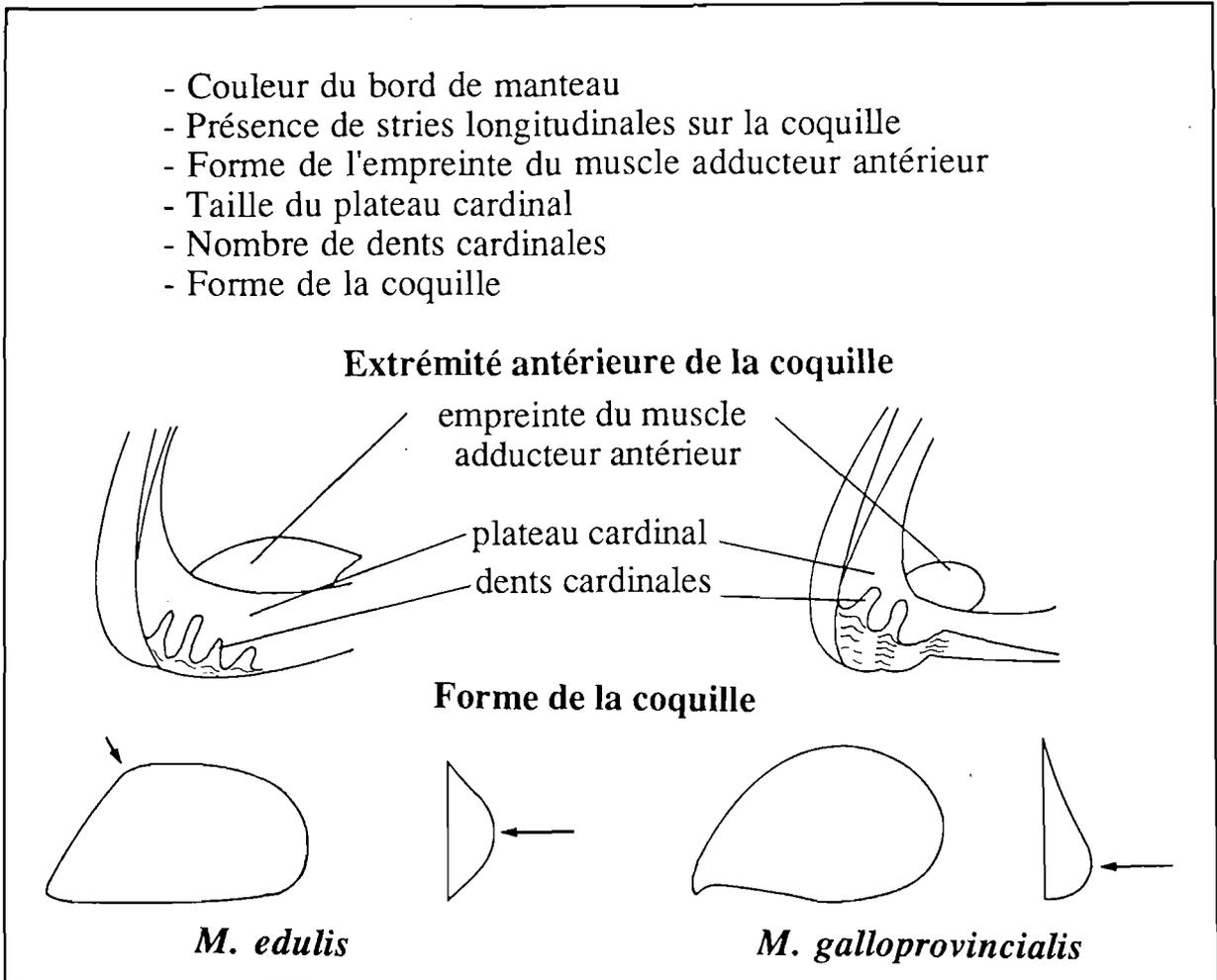


Figure 2: Principaux caractères morphologiques caractéristiques de *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

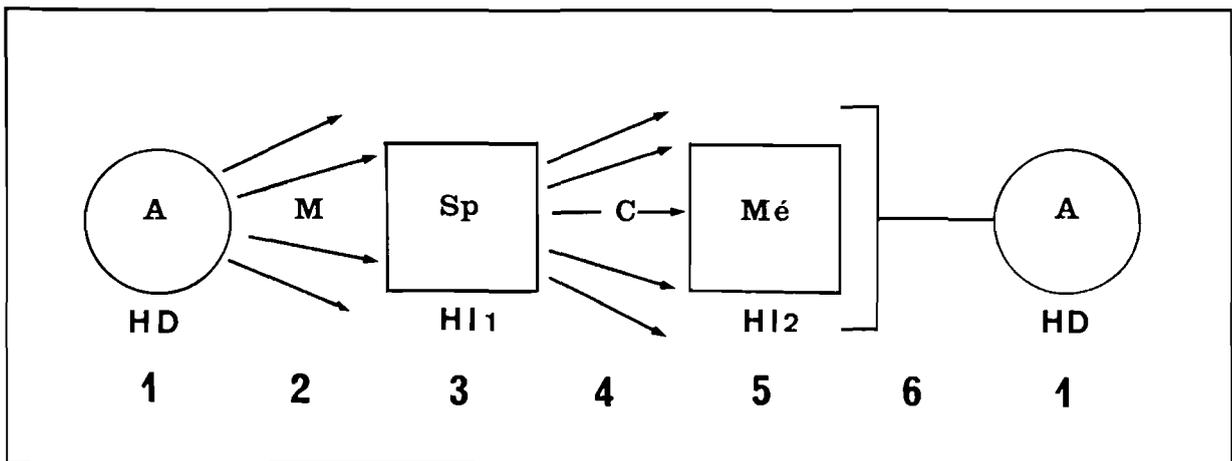


Figure 3: Schéma d'un cycle typique de trématode: 1- L'adulte du trématode (A) se trouve chez un vertébré (hôte définitif HD), souvent dans le tube digestif ou ses dépendances. 2- Les oeufs pondus par l'adulte sont évacués dans le milieu extérieur et donnent naissance, dans l'eau, à une larve nageante ciliée, le miracidium (M). 3- Le miracidium pénètre dans un mollusque aquatique (premier hôte intermédiaire HI 1) et s'y transforme en sporocystes (Sp). Ces sporocystes peuvent donner naissance à des rédies, ou directement à de nombreuses cercaires. 4- Les cercaires quittent le mollusque pour une vie de quelques heures dans le milieu aquatique. 5- Elles pénètrent dans un second hôte intermédiaire (HI 2), dans lequel elles s'enkystent en métacercaires (Mé). 6- Le vertébré hôte définitif se contamine en ingérant l'hôte intermédiaire porteur de métacercaires. Les métacercaires se dékystent dans le tube digestif et deviennent adulte.

de *P. squamatus*. Il existe en effet un critère taxinomique très fiable permettant de caractériser les cercaires des trématodes: il s'agit de la formule excrétrice. C'est l'examen de ce caractère qui nous a permis lors d'un travail préliminaire (Coustau 1987) d'identifier les cercaires observées à celles de *P. squamatus* (*sensu* Matthews 1972).

Les informations concernant le cycle de *P. squamatus* sont très fragmentaires.

Le premier stade larvaire fut uniquement signalé chez *M. edulis*, une fois en mer de Barent (Chubrik 1966) et une fois sur les côtes anglaises (Matthews 1972). L'adulte est signalé par Odhner (1905), Lebour (1908) et Chubrik (1952) dans *Cottus scorpius* L., 1752, et par Nicoll (1914) dans *cottus bubalis* Euphrasen, 1787. Par ailleurs, Matthews (1972) considère les adultes de *P. grandis* Lebour, 1908 décrits chez *Gadus calarias* (L., 1758) et *G. merlangus* L., 1758 comme synonymes de *P. squamatus*. La métacercaire est signalée par Levinsen (1881) chez *Cottus scorpius* et *Liparis liparis* (L.1758).

D'après Chubrik (1952) et Brinkman (1957) *P. squamatus* est une espèce essentiellement arctique, mais Lebour (1908), Nicoll (1914), et Matthews (1972) l'observent sur les côtes britanniques.

Afin de connaître l'hôte définitif responsable de la transmission de *P. squamatus* au sein des populations de moules des côtes françaises, nous avons effectué des prélèvements de différentes espèces de poissons téléostéens présentes sur les côtes de Bretagne et de Normandie. Nous avons pu récolter et examiner les poissons suivants:

- *Blennius ocellaris* L (n=11)
- *Blennius pavo* Risso, 1810 (n=8)
- *Callionymus lyra* L (n=33)
- *Ciliata mustella* L (n=62)
- *Diplodus* sp. (n=10)
- *Gobius coditis* Pallas, 1811 (n=15)
- *Gobius paganellus* L (n=26)
- *Labrus* sp. (n=31)
- *Myoxocephalus scorpius* L (n=25)
- *Symphodus melops* L (n=5)
- *Syngnathus* sp. (n=3)

Seuls deux individus de *Myoxocephalus scorpius* récoltés à Groix présentaient dans leur intestin des adultes correspondant à la description de Chubrik (1952).

D'autres investigations sont nécessaires pour connaître en détail le cycle de *P. squamatus* sur les côtes atlantiques françaises, mais il est probable au vu de nos observations et de celles de Chubrik (1952), que *M. scorpius* constitue l'hôte définitif (ou l'un des hôtes définitifs) de ce trématode.

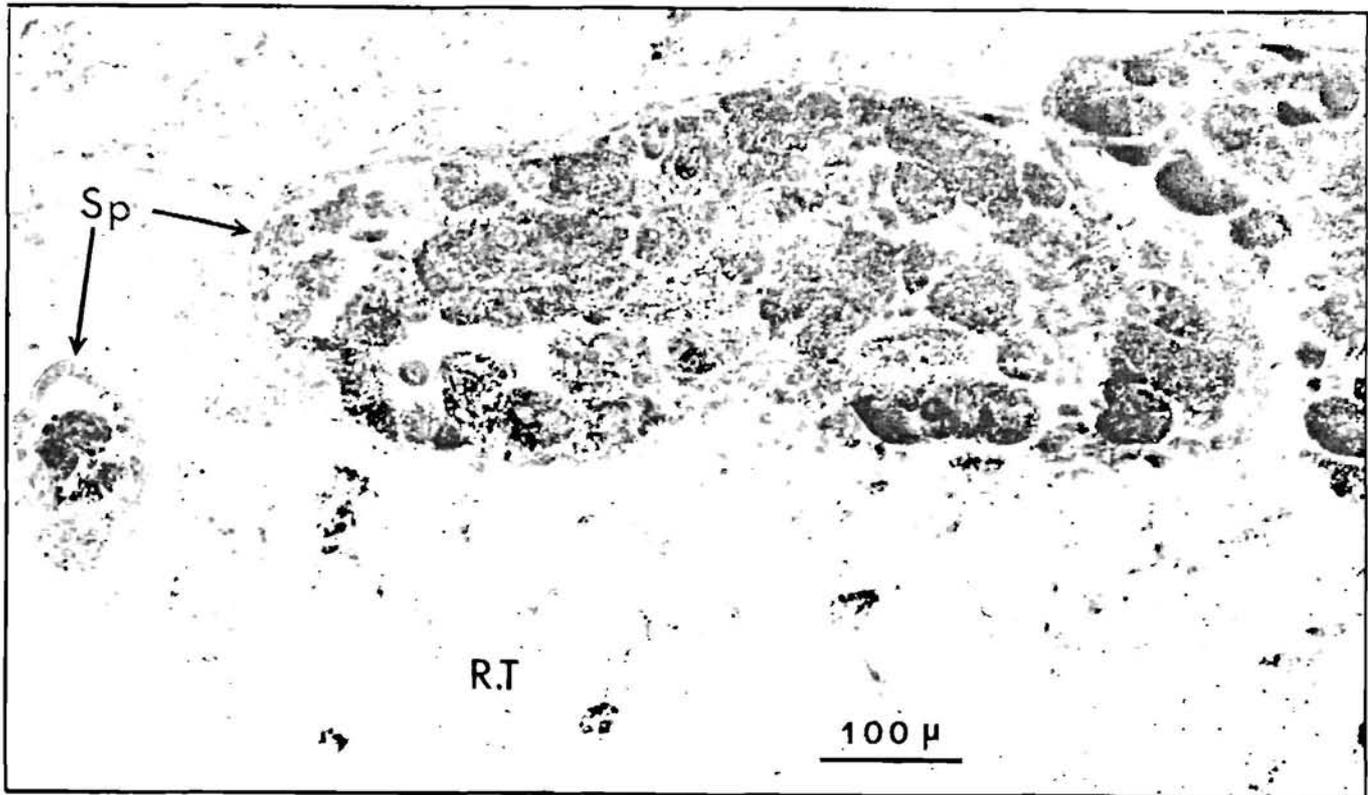
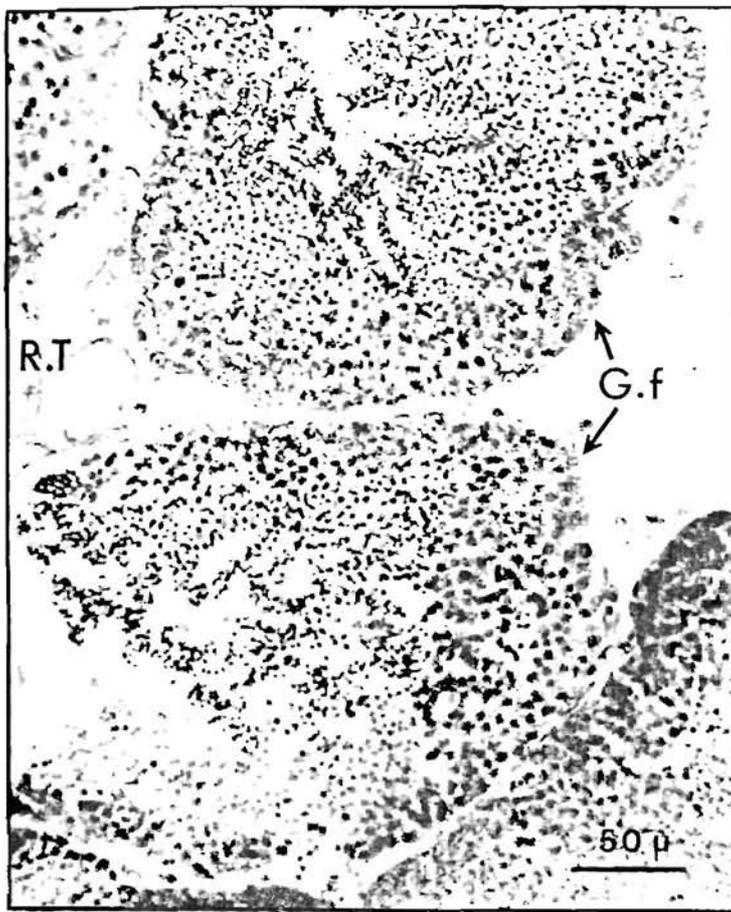


Figure 4: Coupe histologique de manteaux de *M. edulis* : (a) mâle sain, (b) femelle saine, (c) individu infesté par *P. squamatus*. GF: follicules génitaux; RT: tissu de réserve; Sp: sporocystes de *P. squamatus*. Noter l'absence de follicules génitaux au sein du tissu de réserve de l'individu infesté.

III LE SYSTEME HOTE-PARASITE: résultats préliminaires.

* Le bivalve est infesté par un stade larvaire libre: le miracidium. Le site précis de pénétration et de métamorphose de la larve est inconnu. Cette information restera difficile à acquérir étant donné l'impossibilité d'infester le mollusque en laboratoire. Les sporocystes ramifiés de ce trématode se développent au sein des tissus de l'hôte et peuvent envahir tout le corps du mollusque, à l'exception des branchies. Ce développement s'accompagne d'une atrophie des tissus de l'hôte et d'une castration totale (Fig. 4). L'absence d'acini gonadiques est observée même dans les cas de faible développement des sporocystes. Nous n'observons par ailleurs, aucun phénomène de lyse ou de destruction mécanique des tissus hôtes (Coustau *et al.* 1990).

* Les sporocystes de *P. squamatus* présentent un cycle de développement annuel. En Normandie par exemple, il apparaît au cours des mois de Novembre-Décembre, atteint des prévalences maximum en Mars-Avril et disparaît en Juillet-Août.

Cette période de développement coïncide approximativement avec la période de reproduction de l'hôte.

* *P. squamatus* atteint des prévalences particulièrement importantes (60 %) sur les côtes Normandes au sein des populations naturelles et d'élevage de *M. edulis*. Cependant, lors d'un travail préliminaire réalisé à Groix en Vendée (Coustau *et al.* 1990), nous avons pu l'observer au sein de la population naturelle locale dont les individus étaient morphologiquement intermédiaires entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Cette population était toutefois significativement moins infestée que les *M. edulis* d'élevage présentes dans le même site (Fig. 5).

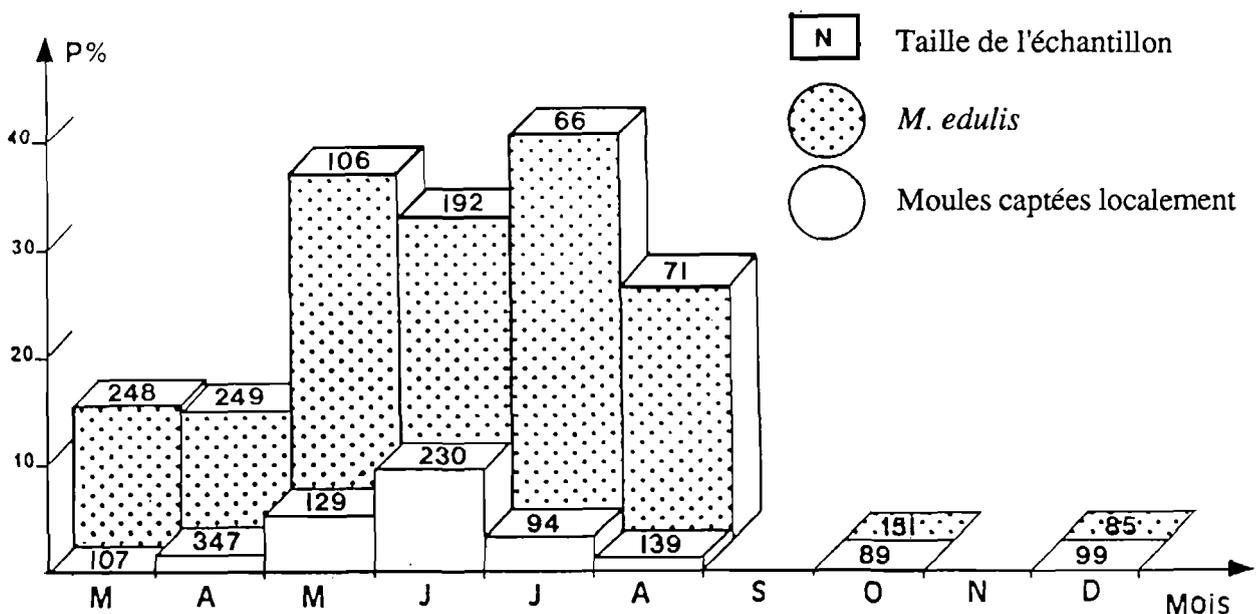


Figure 5: Prévalence de *P. squamatus* au sein de deux échantillons de moules prélevés à Groix.

Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, les différentes expérimentations, méthodologies, et analyses de données utilisées, sont décrites au fur et à mesure dans les chapitres concernés.

**CARACTERISATION DE L'HYBRIDATION ENTRE
MYTILUS EDULIS ET *M. GALLOPROVINCIALIS* SUR LES
COTES ATLANTIQUES FRANCAISES**

CHAPITRE I

CARACTERISATION DE L'HYBRIDATION ENTRE *MYTILUS EDULIS* ET *M. GALLOPROVINCIALIS* SUR LES COTES ATLANTIQUES FRANCAISES.

INTRODUCTION

Plus de 170 taxons appartenant à différentes familles d'animaux ou de végétaux sont actuellement connus pour présenter une zone d'hybridation (Barton et Hewitt, 1989). Le terme de zone d'hybridation désigne, au sens large, des clines ou ensembles de clines géniques entre deux formes parapatriques susceptibles de s'hybrider (Hewitt, 1988). Cependant, ce terme est plus précisément employé lorsque les clines sont maintenus, dans une région étroite, par une balance entre dispersion et sélection contre les hybrides (Barton et Hewitt, 1985). Ces zones hybrides permettent un champ d'investigations considérable en biologie évolutive (Hewitt, 1988). Elles permettent d'apprécier les flux géniques entre populations ainsi que les mécanismes d'isolement ou les barrières génétiques pouvant aboutir aux phénomènes de spéciation. De plus, la grande diversité de génotypes recombinaisonnés qu'elles offrent constitue un véritable laboratoire naturel propice à l'étude des relations hôte-parasites (Hewitt, 1988).

L'hybridation entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* a tout d'abord été mise en évidence sur les côtes britanniques et françaises grâce à des critères morphologiques (Lewis et Seed, 1969; Seed, 1972; Lubet, 1973). L'analyse du polymorphisme enzymatique réalisée sur les côtes britanniques a ensuite permis de compléter ces résultats (Skibinski *et al.*, 1978).

Les échantillons de type morphologique *M. edulis* ou *M. galloprovincialis* présentent de fortes différences dans les fréquences alléliques de plusieurs loci, bien qu'aucun caractère ne soit totalement fixé à un locus donné (système diagnostique) par l'une ou l'autre des deux formes (Gosling, 1984; Beaumont *et al.*, 1989). *M. edulis* est présente sur toutes les côtes Britanniques tandis que *M. galloprovincialis*, présente dans la partie sud de ces côtes, est surtout abondante dans les échantillons du Sud-Ouest de l'Angleterre (Skibinski *et al.*, 1983). Ces deux formes s'hybrident dans tous les sites de

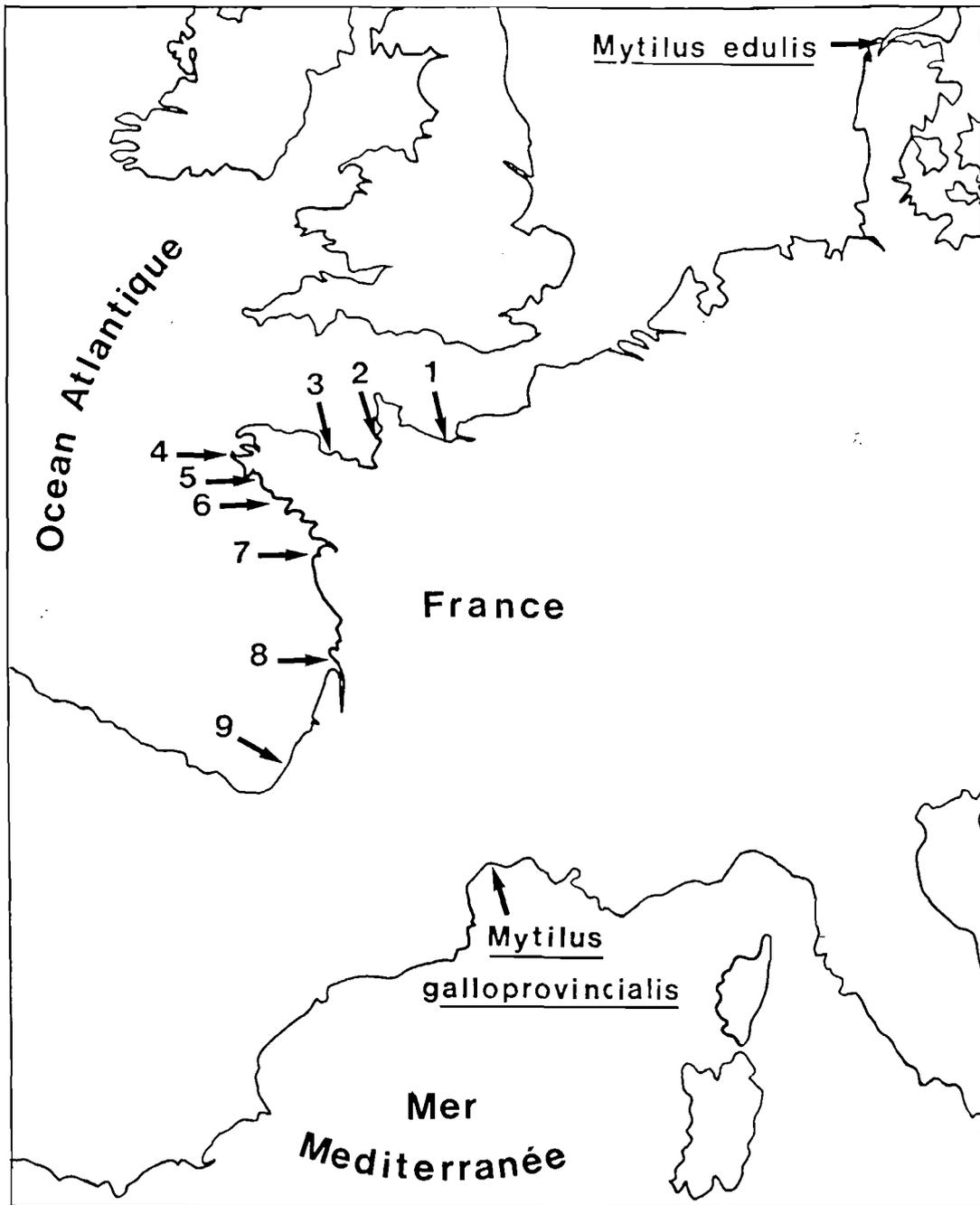


Figure 1: Localisation des prélèvements de *Mytilus* sur les côtes européennes.

syntopie (Skibinski *et al.*, 1983; Gosling, 1984), mais le degré d'hybridation varie d'une localité à l'autre (Skibinski et Beardmore, 1979; Skibinski *et al.*, 1983).

Les populations des îles britanniques constituent donc une mosaïque complexe que l'on ne peut pas réellement comparer aux zones d'hybridation classiques, et qui ne permet pas les mêmes investigations. Le potentiel de dispersion de ces mollusques est fort car les larves sont planctoniques durant 3 à 7 semaines (Bayne, 1976), et le taux de dispersion est probablement variable dans l'espace et dans le temps puisqu'il dépend des courants marins. De plus, la distribution littorale de ces animaux ne correspond pas à une aire de répartition mais à une "ligne de répartition". De ce fait, le concept physique de zone d'hybridation tel qu'il est employé dans la littérature devient inadéquat.

Cependant la démarche fondamentale reste identique et deux principales questions sont posées:

- i) quelles sont les interactions génétiques entre les deux formes différenciées ?**
- ii) que peut-on déduire de ces interactions sur l'évolution des deux taxons au niveau des zones de contact?**

Nous analysons la structure génétique d'échantillons prélevés sur les côtes atlantiques françaises dans le but d'apporter des éléments de réponse supplémentaires à ces questions fondamentales. Ce travail constitue la première étude génétique réalisée dans la zone centrale de l'aire de sympatrie des deux formes.

MATERIEL ET METHODES:

1) Prélèvements:

Neuf populations naturelles de moules ont été échantillonnées sur les côtes atlantiques françaises dans la zone de sympatrie, à Caen (1), Agon-Coutainville (2), Saint Briec (3), Ouessant (4), La Forêt Fouesnant (5), Groix (6), Noirmoutier (7), Royan (8), et Biarritz (9) (Fig. 1). Dans chaque site, les animaux ont été prélevés sur un même rocher.

Deux échantillons de référence pour *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ont été prélevés en dehors de la zone de sympatrie, à Livo (Danemark, Mer du Nord) et à Sète (France, Méditerranée) respectivement (Fig 1).

Le muscle adducteur antérieur et la glande digestive sont prélevés pour chaque individu et conservés à - 80°C jusqu'à analyse. Les tissus congelés sont broyés dans de

l'eau distillée puis centrifugés, le surnageant servant de source d'enzyme pour l'analyse électrophorétique.

2) Analyse du polymorphisme enzymatique:

Les procédures d'électrophorèse sur gel d'amidon et de révélation d'activités enzymatiques sont inspirées de celles décrites par Pasteur *et al.* (1987) et adaptées à notre matériel; elles sont détaillées dans l'annexe I. Nous avons choisi pour cette étude les locus connus pour permettre la meilleure discrimination entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Il s'agit des locus codant les systèmes enzymatiques Estérase D (EST D), Leucine aminopeptidase (LAP), Phosphoglucose isomerase (PGI), Octopine déshydrogénase (ODH), et Mannose phosphate isomérase (MPI) (Skibinski *et al.*, 1980; Beaumont *et al.*, 1989). Pour chaque locus les allèles sont numérotés par ordre de mobilité anodale croissante.

3) Traitement des données:

* La différenciation génétique entre populations a été étudiée par l'analyse factorielle des correspondances (AFC) (Benzécri, 1982) grâce au logiciel Biomeco. L'AFC est réalisée sur le tableau de contingence (échantillon x allèle) dans lequel chaque échantillon est caractérisé par ses effectifs alléliques (= nombre de fois où l'on a compté chaque allèle dans l'échantillon). Cette méthode d'analyse est bien adaptée aux données de génétique des populations (She *et al.*, 1987). Elle traite la somme des informations obtenues pour chaque échantillon, puis positionne l'ensemble des points échantillons et des points variables (allèles) dans un espace multidimensionnel. Cette analyse utilise la métrique du X^2 centrée sur la loi marginale du tableau de données. De ce fait, l'origine (=intersection des axes factoriels) est située au centre de gravité du nuage de points, et la distance qui sépare deux points est la distance distributionnelle du X^2 . Entre autre avantage, cette technique présente pour nous l'intérêt de: i) caractériser simultanément chaque échantillon en fonction de l'ensemble des variables génétiques (allèles), et ii) calculer la contribution de chaque allèle à la variabilité globale des échantillons.

Afin d'éviter de provoquer des distorsions du nuage de points (Berrebi, 1988) les allèles dont la fréquence est inférieure à 1% sur l'ensemble des individus ont été traités en variables supplémentaires, c'est à dire qu'ils ne participent pas à l'élaboration des axes factoriels.

* La **diversité génétique intrapopulationnelle** a plus particulièrement été étudiée au niveau des locus EST D et MPI, car ils présentent les plus fortes différences de fréquences alléliques entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* et permettent donc la meilleure discrimination des deux formes à l'échelle individuelle. A partir de la comparaison des fréquences alléliques des deux échantillons de *M. edulis* (Mer du Nord) et *M. galloprovincialis* (Méditerranée), nous avons pu établir des allèles synthétiques (Skibinski *et al.* 1983) (= regroupement d'allèles) caractéristiques de *M. galloprovincialis* et de *M. edulis*.

L'**équilibre panmictique des distributions génotypiques** observées est testé pour chaque échantillon par un test G (Sokal et Rohlf, 1969), ou test du rapport de vraisemblance de Wilks (Scherrer, 1984). La variable G suit approximativement une distribution du X^2 et les hypothèses sont identiques à celles du X^2 . Ce test est encore plus robuste que le X^2 et supporte des entorses importantes à la règle de Cochran (selon laquelle 80% au moins des classes doivent avoir un effectif théorique supérieur à 5).

Le **déficit en hétérozygotes** est calculé pour chaque échantillon et à chaque locus par l'indice $D=[H_o-H_e]/H_e$, où H_o est le nombre d'hétérozygotes observés, et H_e le nombre d'hétérozygotes attendus sous l'hypothèse de panmixie (Selander, 1970).

RESULTATS:

1) Différenciation génétique entre échantillons:

* Le tableau I des fréquences alléliques met en évidence une forte différenciation génétique entre les deux formes extrêmes *M. edulis* (Mer du Nord) et *M. galloprovincialis* (Méditerranée). Les échantillons prélevés sur les côtes atlantiques françaises (1 à 9) montrent de fortes covariations alléliques aux cinq locus (Tab. 1). Ces covariations ne correspondent pas à un gradient géographique. Nous observons une différenciation multilocus entre populations adjacentes (8 et 9 par exemple), et une similarité génétique entre populations géographiquement éloignées (1, 2, et 8).

Les échantillons 1, 2, 7, et 8 présentent des fréquences alléliques proches de celles de *M. edulis* du Danemark, alors que l'échantillon 9 présente des fréquences alléliques proches de celles de *M. galloprovincialis* de Méditerranée. Les fréquences alléliques des échantillons 3, 4, 5, et 6 sont intermédiaires entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

Tableau I: Fréquences alléliques des deux échantillons de référence *M. edulis* (.ed) de Mer du Nord et de *M. galloprovincialis* (.gal) de Méditerranée, et des neuf échantillons prélevés sur les côtes atlantiques françaises. n = nombre de gènes analysés.

n	.ed 80	.gal 112	1 156	2 310	3 164	4 106	5 142	6 124	7 100	8 136	9 128	
Alleles												
EST D	1	.01	.03	.0	.01	.02	.0	.01	.02	.01	.0	.02
	2	.0	.93	.08	.03	.30	.77	.44	.64	.06	.06	.84
	3	.01	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0	.0
	4	.98	.04	.88	.94	.67	.23	.53	.34	.92	.90	.14
	5	.0	.0	.04	.02	.01	.0	.02	.0	.01	.04	.0
LAP	1	.01	.0	.0	.02	.01	.01	.0	.0	.01	.01	.01
	2	.26	.02	.11	.11	.09	.21	.08	.06	.13	.14	.04
	3	.0	.05	.0	.01	.0	.0	.01	.01	.02	.0	.01
	4	.53	.31	.56	.64	.59	.44	.51	.56	.57	.63	.46
	5	.01	.01	.01	.01	.01	.0	.01	.01	.0	.0	.0
	6	.16	.56	.32	.20	.30	.34	.37	.32	.24	.22	.44
	7	.03	.05	.0	.01	.0	.0	.02	.04	.03	.0	.04
PGI	1	.0	.0	.01	.0	.01	.0	.0	.01	.01	.0	.02
	2	.02	.0	.01	.01	.01	.01	.0	.04	.02	.01	.01
	3	.05	.02	.05	.03	.05	.07	.08	.03	.07	.04	.12
	4	.23	.78	.26	.30	.38	.37	.42	.52	.33	.30	.52
	5	.18	.15	.04	.06	.11	.31	.11	.18	.10	.06	.14
	6	.50	.05	.56	.57	.42	.23	.37	.18	.44	.53	.18
	7	.02	.0	.07	.03	.02	.01	.02	.04	.03	.06	.01
OCT	1	.0	.0	.01	.0	.0	.01	.02	.01	.01	.0	.02
	2	.05	.09	.04	.08	.25	.46	.30	.36	.12	.09	.44
	3	.76	.22	.90	.86	.58	.33	.56	.47	.79	.88	.23
	4	.01	.0	.0	.0	.0	.01	.01	.0	.0	.0	.0
	5	.18	.69	.05	.06	.17	.19	.11	.16	.08	.03	.31
MPI	1	.04	.96	.09	.07	.33	.75	.48	.67	.15	.06	.87
	2	.96	.03	.91	.91	.67	.25	.52	.32	.84	.93	.13
	3	.0	.01	.0	.02	.0	.0	.0	.01	.01	.01	.0

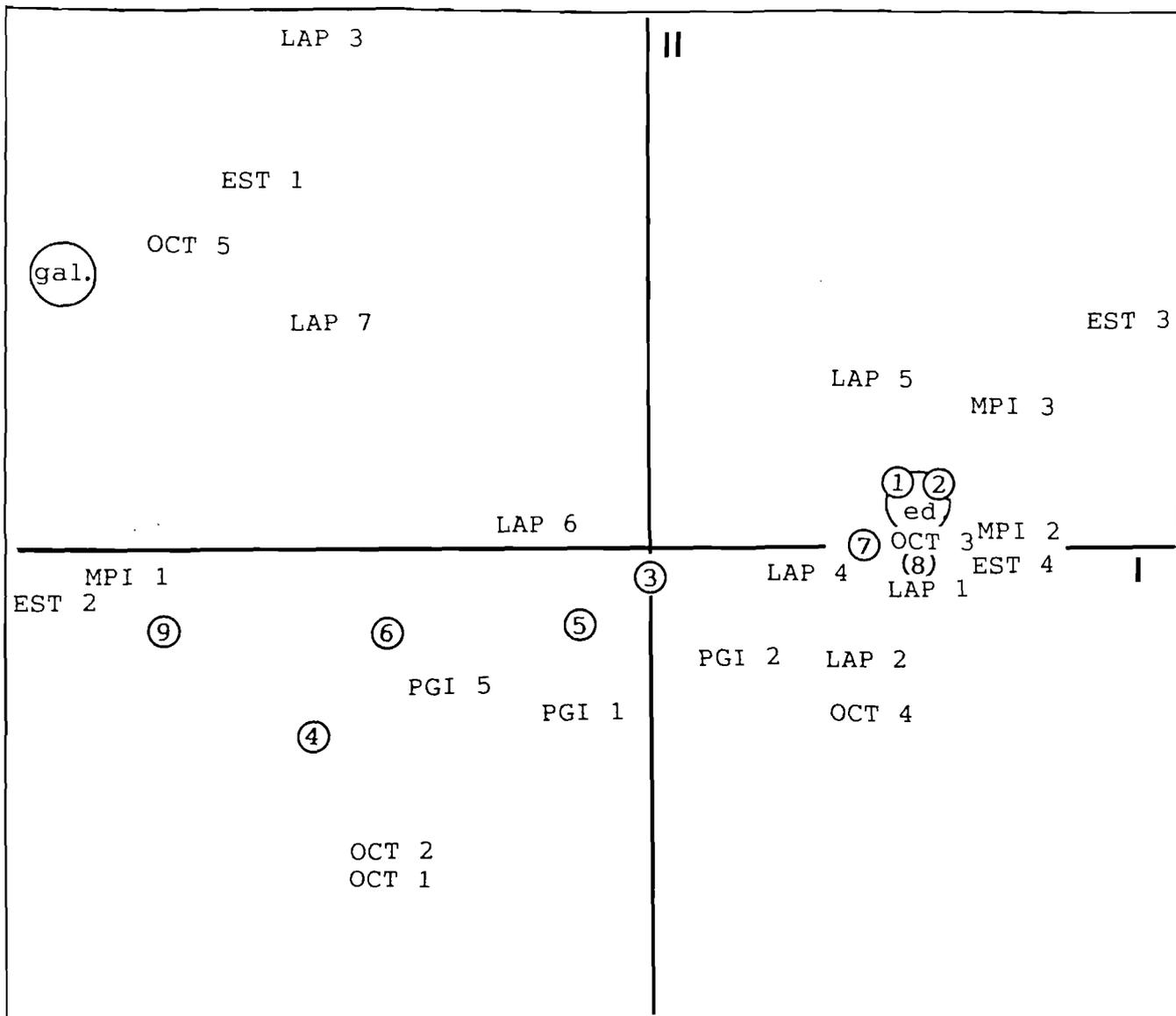


Figure 2: Projection sur le premier plan de l'analyse factorielle des correspondances des centres de gravité des *M. edulis* de Mer du Nord (ed), des *M. galloprovincialis* de Méditerranée (gal), des neuf échantillons désignés par leur numéro, ainsi que des variables alléliques.

* L'AFC fournit une représentation de la différenciation inter-échantillon en fonction des 25 variables alléliques analysées (Fig. 2). Le plan formé par les deux premiers facteurs représente 92 % (84% + 8%) de la variabilité globale des échantillons. De plus, les centres de gravité présentent de forts coefficients de corrélation avec le plan de projection (Tab II) ce qui confirme que le positionnement des points sur la fig 2 est proche de leur positionnement réel dans l'espace multidimensionnel.

Tableau II: Valeurs des coefficients de corrélation des points échantillons avec le premier plan de l'AFC.

<i>ed.</i>	0,63	3	0,12	7	0,79
<i>gal.</i>	0,99	4	0,90	8	0,93
1	0,84	5	0,76	9	0,96
2.	0,96	6	0,86		

Seul le point 3 (Tab. II) est faiblement corrélé aux deux premiers facteurs ainsi qu'aux facteurs suivants. Ce résultat est lié à sa position très proche de l'origine du nuage de points. La projection (Fig. 2) montre principalement une différenciation des échantillons selon l'axe I. Cette différenciation est essentiellement due aux valeurs très élevées des variables EST D 2 et MPI 1 chez *M. galloprovincialis*, et des variables EST D 4 et MPI 2 chez *M. edulis*. La somme des contributions de ces variables à l'inertie de l'axe I est de 67 %. La différenciation des échantillons selon l'axe II est due aux variables ODH 2 et ODH 5; ODH 5 étant l'allèle le plus fréquent chez *M. galloprovincialis* de Méditerranée uniquement, et ODH 2 étant fréquent seulement dans les populations intermédiaires.

Notons que la forme parabolique du nuage de points traduit un "effet Guttman" (Benzécri, 1982). Ce phénomène apparaît lorsque les informations traitées sont régulièrement réparties entre deux types extrêmes d'informations.

La différenciation des échantillons se fait donc suivant un gradient génétique unidirectionnel *M. galloprovincialis* / *M. edulis* représenté essentiellement par l'axe I de L'AFC. La position des échantillons le long de cet axe (Fig. 2) peut, dans cette analyse, être interprétée comme une évaluation de leur degré d'introgession génique.

2) Variabilité génétique intra-échantillons:

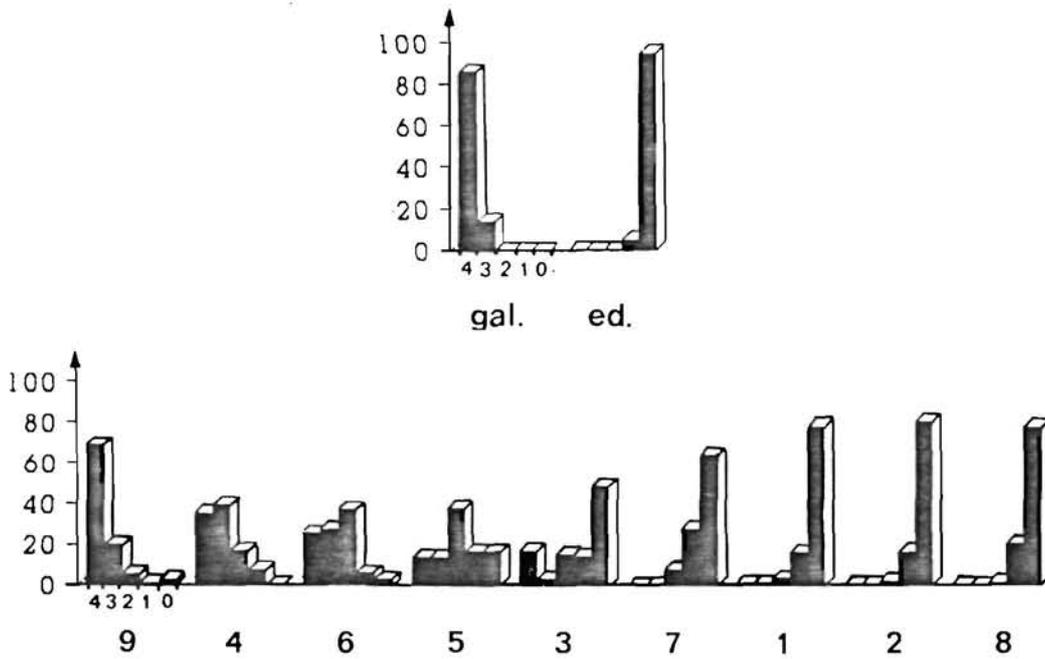


Figure 3: Fréquences relatives d'individus présentant 4, 3, 2, 1, ou 0 "allèles synthétiques *galloprovincialis* " dans les deux échantillons de références "ed" (*edulis*) et "gal" (*galloprovincialis*) et dans les neuf échantillons analysés. Les "allèles *galloprovincialis* " sont comptés au niveau des locus EST D et MPI. Il s'agit des allèles 1 + 2 pour EST D et de l'allèle 1 pour MPI. Les échantillons 1 à 9 sont disposés selon le gradient *edulis/galloprovincialis* indiqué sur la figure 2.

Tableau III: Mesure du déficit en hétérozygote $D=H_o-H_e/H_e$, et test de conformité des distributions génotypiques par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg. (G Test) pour les onze échantillons. * = valeur de G significative au seuil de 0,05; ** = valeur de G significative au seuil de 0,01; les autres valeurs étant non significatives au seuil de 0,05. Effectifs identiques au Tab. I. (Le calcul de D n'a pas été réalisé lorsque $H_e < 5\%$ de l'effectif de l'échantillon).

	EST D	LAP	PGI	Oct-57	MPI
ed.	--	0.0	- 0.05	- 0.67**	--
gal.	--	- 0.14	- 0.10	+ 0.06	- 0.06
1	- 0.05	- 0.25	- 0.04	- 0.09	- 0.20
2	0.0	- 0.07	- 0.12	- 0.07	+ 0.13
3	- 0.45**	+ 0.04	- 0.26	- 0.19	- 0.47**
4	- 0.03	- 0.02	- 0.19	- 0.22	+ 0.16
5	- 0.03	- 0.20	- 0.09	+ 0.03	- 0.15
6	+ 0.08	+ 0.04	- 0.09	- 0.05	+ 0.05
7	+ 0.06	- 0.14	- 0.10	+ 0.08	+ 0.17
8	+ 0.02	- 0.09	- 0.19	+ 0.01	- 0.23
9	- 0.18	+ 0.10	- 0.24	+ 0.10	- 0.45*

Afin de savoir si les échantillons intermédiaires 3, 4, 5, et 6 sont composés d'individus hybrides, ou bien s'ils sont le résultat d'un simple "mélange" d'individus typiquement *edulis* et typiquement *galloprovincialis*, la structure génotypique dilocus de chaque échantillon est analysée. Seuls sont considérés ici les deux loci EST D et MPI permettant la meilleure discrimination entre *edulis et galloprovincialis* (Tab. I, Fig 2). La figure 3 montre une forte variabilité génétique intra-échantillon. Les échantillons 3, 4, 5, et 6 présentent des génotypes typiquement *M. edulis*, typiquement *M. galloprovincialis* et des génotypes intermédiaires en proportions différentes, indiquant que l'hybridation se produit dans ces sites. L'hybridation semble être partielle dans l'échantillon 3, et relativement forte au sein des échantillons 4, 5, et 6.

Ceci est confirmé lorsque l'on considère les fréquences génotypiques aux cinq loci séparément: celles des échantillons 4, 5, et 6 ne diffèrent pas significativement de celles attendues en condition de panmixie (Tab III).

DISCUSSION

De nombreux auteurs utilisent le terme d'hybridation pour désigner le croisement entre deux génotypes parentaux, et celui d'introgession lorsque les croisements se poursuivent entre génotypes recombinés. L'absence de marqueurs diagnostiques entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ne nous permet pas de faire cette distinction avec rigueur. Nous utiliserons donc dans cette discussion le terme d'hybridation dans son sens large incluant les deux situations précédemment citées.

La forte variabilité génétique des échantillons prélevés sur les côtes atlantiques françaises peut clairement être attribuée à la présence conjointe de *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Nos résultats montrent que sur les côtes Françaises, comme sur les côtes des îles Britanniques (Gosling, 1984), des hybrides sont présents dans tous les sites de syntopie. Les fréquences génotypiques monolocus observées pour tous les échantillons excepté le 3 (au locus ESR D et MPI) et le 9 (au locus MPI) ne permettent pas de rejeter l'hypothèse de panmixie. Ce résultat confirme l'absence de barrière génétique de reproduction entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* (Skibinski et Beardmore, 1979), et pose le problème de l'évolution de ces deux formes au sein de la zone de contact.

Quelle est l'influence respective du flux génique, et de la sélection naturelle sur les structures génétiques observées et sur leur évolution?

Le flux génique peut se décomposer en deux éléments qui sont le **brassage génétique** intra-site c'est à dire, dans notre exemple, l'étendue de l'hybridation dans les populations locales, et la **migration** ou dispersion inter-sites.

* En ce qui concerne le brassage génétique au sein des populations, nos résultats peuvent s'expliquer par un brassage très important. Une exception existe pour le site 3: l'hybridation y est partielle, ce qui mérite d'être discuté en fonction des particularités de ce site. La baie de Saint Brieuc (site 3) est en effet un site mytilicole où d'énormes stocks de *M. edulis* destinés à la commercialisation sont importés chaque année et installés sur 80 km de bouchots. Il est donc probable que les individus de type *edulis* présents dans la population locale de ce site appartiennent au pool génique des *M. edulis* d'élevage, alors que les individus de type *galloprovincialis* constituent la véritable population naturelle.

L'effet Wahlund engendré par cette situation ne peut pas expliquer entièrement la structure génétique de cet échantillon. En effet, étant donné que cet élevage existe depuis plusieurs dizaines d'années, il est source d'un apport régulier d'individus *M. edulis* dans la population naturelle locale. Si les probabilités de croisement des différents génotypes étaient identiques, la forme *M. galloprovincialis* devrait rapidement perdre son identité génétique. Or, environ 20% des individus sont typiquement *M. galloprovincialis*. L'hypothèse d'une contre sélection des génotypes recombinants ne peut être retenue pour expliquer les fréquences génotypiques observées, car l'apport régulier d'individus *M. edulis* couplé à une mortalité différentielle des hybrides provoquerait la disparition des gènes *M. galloprovincialis* dans la population naturelle.

La possibilité d'un décalage dans la période de reproduction des deux formes dans ce site doit être envisagée. Seed (1971) a mis en évidence un décalage dans les périodes de reproduction de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* dans le sud-ouest de l'Angleterre, zone où les deux formes ne s'hybrident que très partiellement (Skibinski et Beardmore, 1979). La durée du cycle sexuel, la fréquence et la répartition temporelle des périodes d'émission des gamètes subissent, chez les deux formes, de fortes variations en fonction de la latitude (Lubet, 1981). Lorsque l'on compare les données rassemblées sur *M. edulis* (Lubet, 1981) et sur *M. galloprovincialis* (Lubet *et al.*, 1981) à l'échelle macrogéographique, on peut remarquer que leurs périodes de reproduction se

chevauchent plus ou moins en fonction de la latitude. On peut penser que ce phénomène est également induit au niveau microgéographique par les conditions environnementales locales (Newell *et al.*, 1982).

Les sites 4, 5, et 6 de notre étude pourraient donc correspondre à une zone écologique intermédiaire où les périodes de reproduction se chevauchent largement ou totalement, alors que dans le site 3 ces périodes seraient décalées.

L'hypothèse d'un décalage dans les périodes de reproduction, variable suivant les sites, pourrait expliquer, d'une part, la diversité des taux d'hybridation observés dans les sites de syntopie des côtes françaises et Britanniques (Skibinski *et al.*, 1983), d'autre part, l'apparente stabilité dans le temps de populations constituées d'un mélange de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* typiques (Beaumont *et al.*, 1989).

* Le fort potentiel de dispersion des larves de *Mytilus* et la grande différenciation génétique des populations locales rend très probable l'échantillonnage, en un point donné, d'individus provenant de pools géniques différenciés (effet Wahlund). Ainsi, l'échantillon 9, majoritairement de type *M. galloprovincialis*, contient deux individus typiquement *edulis* provenant certainement d'un autre site de reproduction.

Il est par contre étonnant de constater que parmi les 9 populations géographiques échantillonnées sur les côtes atlantiques françaises, 7 échantillons présentent aux cinq locus étudiés des fréquences génotypiques qui ne sont pas statistiquement différentes de celles attendues selon l'équilibre panmictique.

Un déficit en hétérozygotes initial couplé avec une contre-sélection des homozygotes pourrait amener une population à passer par un état d'équilibre génotypique (Diehl et Koehn, 1985; Blanc et Bonhomme, 1987; Gaffney, 1990). Cette hypothèse demande cependant trop de coïncidences pour expliquer la structure génétique observées dans les 7 échantillons.

Une autre possibilité serait celle d'un isolement presque total des populations de certaines localités du à une dispersion efficace relativement faible (Koehn *et al.*, 1976). Il est en effet concevable que la majorité des larves recrutées dans un site puissent provenir d'adultes fixés dans ou à proximité de ce site. Il existe peu de données sur la dispersion des larves planctoniques de mollusques marins en milieu naturel (Cameron, 1986; Butman, 1987). Cependant, lors d'un suivi en populations naturelles du recrutement de *Haliotis rubra* en fonction de l'hydrodynamique, McShane *et al.* (1988) ont montré, au niveau de trois récifs du sud de l'Australie, une dispersion efficace localisée. Les larves de mollusques, entraînées par les courants océaniques et soumises

à une dispersion pélagique, présentent une forte mortalité (Cameron, 1986) probablement liée aux faibles chances de rencontrer le substrat adéquat (McShane *et al.* 1987).

Des travaux expérimentaux suggèrent que la métamorphose des larves de *Haliotis* est chimiquement induite au contact du substrat adéquat (Morse et Morse 1984), ou des adultes de la même espèce (Seki et Kan-No, 1981). De même, chez *M. edulis*, la métamorphose des larves est expérimentalement stimulée par des substances extraites du pied d'adultes (Estupinan et Waite, 1988). Si de telles interactions larves-adultes existent dans le milieu naturel, elles sont susceptibles de jouer un rôle stabilisant dans l'évolution de la structure génétique des populations locales.

* Le rôle que peut théoriquement jouer la dispersion larvaire sur l'homogénéisation génétique des populations est accentué, sur les côtes atlantiques françaises, par les nombreux transferts et implantations de moules destinées à la commercialisation. En France, plus encore que sur les côtes des îles Britanniques, on peut s'attendre à une hétérogénéité intra-échantillon conduisant, par le jeu de l'hybridation, à une homogénéisation totale des pools géniques. Or, *M. edulis* et *M. galloprovincialis* conservent leur identité génétique dans de nombreux sites et ceci suggère l'action de fortes pressions sélectives environnementales différentielles. Les résultats de plusieurs études suggèrent que ces deux formes présentent des adaptations différentes vis à vis des conditions environnementales telles que l'exposition aux vagues (Gosling et Wilkins, 1981; Skibinski *et al.*, 1983), ou la température (Lubet *et al.*, 1986). De plus, une sélection différentielle, attribuée à des facteurs physico-chimiques, a été mise en évidence dans certains sites d'hybridation (Skibinski, 1983; Gardner et Skibinski, 1988).

L'exemple du site 3 de notre étude peut confirmer l'hypothèse de pressions sélectives différentielles locales. Chaque année, les quantités importantes de *M. edulis* importées se développent et atteignent le stade adulte dans cette baie. Or, les moules recrutées localement ont toujours présenté essentiellement des caractères morphologiques de *M. galloprovincialis*, ce qui justifie l'importation de naissains de *M. edulis* (Friou comm. pers.). Il semble donc que dans ce site, de fortes pressions de sélection agissent contre *M. edulis*. Ces pressions peuvent soit, perturber ou bloquer le déroulement de la gamétogenèse, soit causer une forte mortalité des larves de *M. edulis*.

* En conclusion, les résultats de notre travail appuient l'hypothèse de fortes mortalités génotype-dépendantes intervenant au cours de la phase pré-recrutement ou

post-recrutement (Gartner-Kepkay *et al.*, 1983; Skibinski, 1983; Gardner et Skibinski, 1988; Johannesson *et al.*, 1990), réduisant l'amplitude de la dispersion efficace. Notons que ces mortalités génotype-dépendantes ne s'effectueraient pas particulièrement au dépend des hybrides mais au dépend de l'une ou l'autre des formes parentales en fonction des conditions environnementales.

Il semble donc peu probable que les populations de la zone de sympatrie puissent évoluer vers une homogénéisation.

Gardner et Skibinski (1988), et Beaumont *et al.* (1989) ont montré que la structure génétique de certaines populations partiellement introgressées du sud-ouest de l'Angleterre était stable dans le temps. Bien que les résultats de notre travail soient ponctuels, l'apparent état d'équilibre génotypique des populations françaises suggère une absence d'effet Wahlund temporel (Gosling et Wilkins, 1985; Borsa *et al.*, *ss presse*) et appuie donc l'hypothèse d'une stabilité au cours de ces dernières années. La mosaïque génétique complexe de la zone de sympatrie pourrait se trouver dans un état d'équilibre entre sélection et flux génique.

Toutefois, le rôle important que peuvent théoriquement jouer les courants sur la dispersion des larves et donc sur la dynamique et la structure génétique des populations naturelles de *Mytilus* est peu compatible avec l'hypothèse de stabilité. Il serait donc nécessaire d'acquérir des connaissances supplémentaires sur la biologie de la reproduction, sur les modalités de dispersion et de recrutement de ces bivalves en fonction de l'environnement littoral, pour mieux comprendre les interactions génétiques intra et inter-sites.

**SPECIFICITE DE *P. SQUAMATUS* AU SEIN DU COMPLEXE
MYTILUS EDULIS / *GALLOPROVINCIALIS*.**

CHAPITRE II

SPECIFICITE DE *P. SQUAMATUS* AU SEIN DU COMPLEXE *MYTILUS EDULIS* / *GALLOPROVINCIALIS*.

INTRODUCTION

Le degré d'exigence et de spécialisation d'un parasite vis à vis de son biotope (hôte) peut s'appréhender par l'étude de la diversité génétique des individus hôtes compatibles avec le développement et la transmission du parasite. Cette approche intègre plusieurs niveaux de perception de la diversité génétique de l'hôte. On peut en effet distinguer:

- i) des individus hôtes appartenant à une ou plusieurs espèces,
- ii) des individus hôte appartenant à certaines populations d'une même espèce,
- iii) des individus susceptibles au sein d'une même population.

En ce qui concerne les systèmes mollusques-trématodes, de nombreux travaux ont été réalisés à l'échelle des espèces hôtes (voir Yamaguti, 1971). Par contre, ces interactions hôte-parasite sont beaucoup moins étudiées aux échelles inter- et intra-populationnelles et ce type de travail s'effectue essentiellement sur des souches de gastéropodes dont l'élevage et l'infestation sont contrôlés en laboratoire (Richards, 1975; Michelson et Dubois, 1981; Mulvey et Woodruff, 1985; Claveria et Etges, 1987).

Des études en populations naturelles ont cependant été réalisées au sein des zones d'hybridation dans le cas des souris *Mus musculus musculus* et *M. musculus domesticus* (Sage *et al.*, 1986; Moulia *et al.*, *ss presse*), et dans celui des cotonniers *Populus fremontii* et *P. angustifolia* (Whitham, 1989). Ces recherches montrent que les individus hybrides ou introgressés sont beaucoup plus infestés que chacune des deux formes parentales. Ces différences ne pouvant être expliquées par des facteurs environnementaux; il semble que, dans ce cas, les génotypes introgressés soient beaucoup plus susceptibles au parasitisme que les génotypes parentaux.

La forte variabilité génétique observée entre et dans les populations de *Mytilus* des côtes françaises est également favorable à des investigations en milieu naturel. Cependant, contrairement aux nématodes de souris (Sage *et al.*, 1986) et aux aphidiens

du coton (Whitham, 1989) *P. squamatus* n'est pas un parasite à cycle direct. Sa présence au sein d'une population de moules dépend non seulement de la susceptibilité des individus de la population en question, mais aussi de la présence, dans le site, du poisson hôte définitif. De ce fait, l'étude comparée du parasitisme à partir d'échantillons prélevés au sein de populations naturelles ne constitue pas une approche fiable, et nous avons choisi de **tester l'association entre parasite et génotypes hôtes** en soumettant les différents individus (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* et leurs hybrides) à l'infestation naturelle dans un même lieu et durant la même période. Au cours de cette expérimentation en milieu naturel, la probabilité d'infestation de chaque génotype est considérée comme identique.

MATERIEL ET METHODES:

1) Protocole expérimental:

Le test de susceptibilité à *P. squamatus* a été effectué sur trois échantillons de la zone de sympatrie, prélevés respectivement à Groix, Noirmoutier et Saint Briec (Fig 1)(les stations précises de prélèvement sur les sites sont différentes de celles des échantillons étudiés au chapitre I). Du naissain (moules de 3 à 8 mm) a été prélevé en Juillet 1987 dans chacun de ces trois sites, puis immédiatement transféré au sein d'un élevage sur filières flottantes (Fig 2) situé à groix (Fig 1) où la parasitose est présente (Coustau *et al*, 1990).

Afin de s'assurer que les 3 naissains étaient bien sains lors du prélèvement, 3 lots témoins provenant des mêmes naissains ont été installés, au même moment, à la Trinité sur mer, où le parasite est absent. Les échantillons témoins et expérimentaux ont été maintenus en élevage durant 1 an puis prélevés le même jour, à la même profondeur (2 m). Les individus ont été disséqués sous une loupe binoculaire afin de détecter la présence de *P. squamatus*.

Les individus des lots expérimentaux ont été numérotés, les données parasitologiques ont ensuite été notées, puis le muscle adducteur antérieur et la glande digestive ont été prélevés et stockés pour l'analyse génétique.

Les individus appartenant aux lots témoins ont simplement été disséqués; aucun d'entre eux n'était infesté.

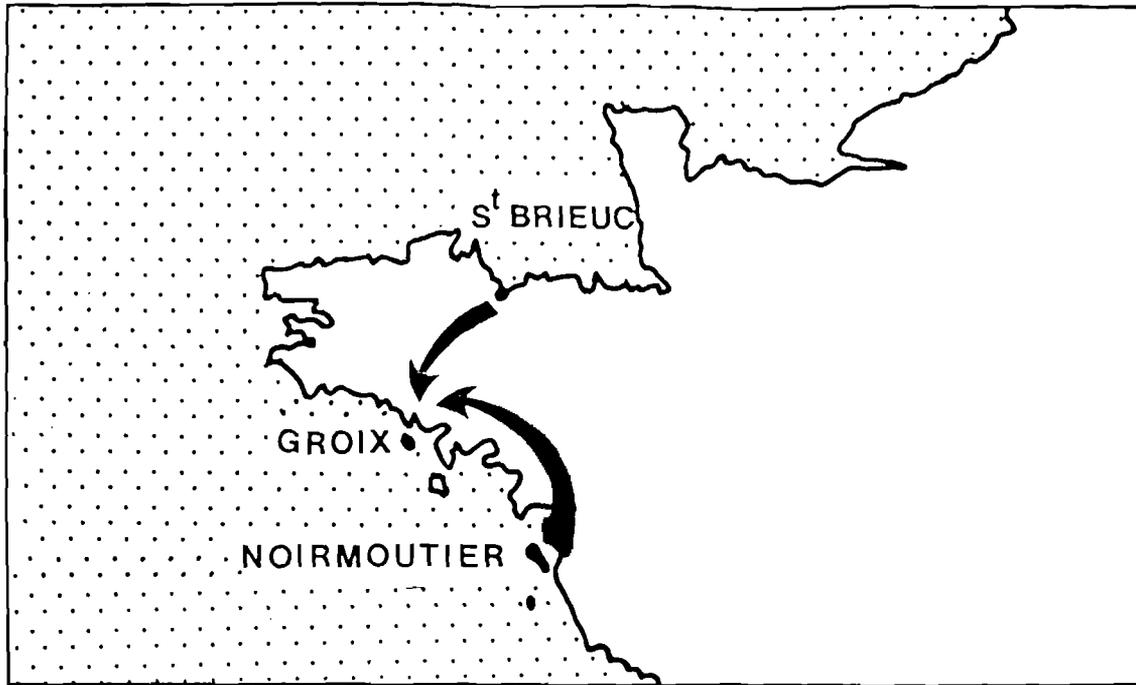


Figure 1: Sites de prélèvement des naissains et de mise en place de l'expérimentation.

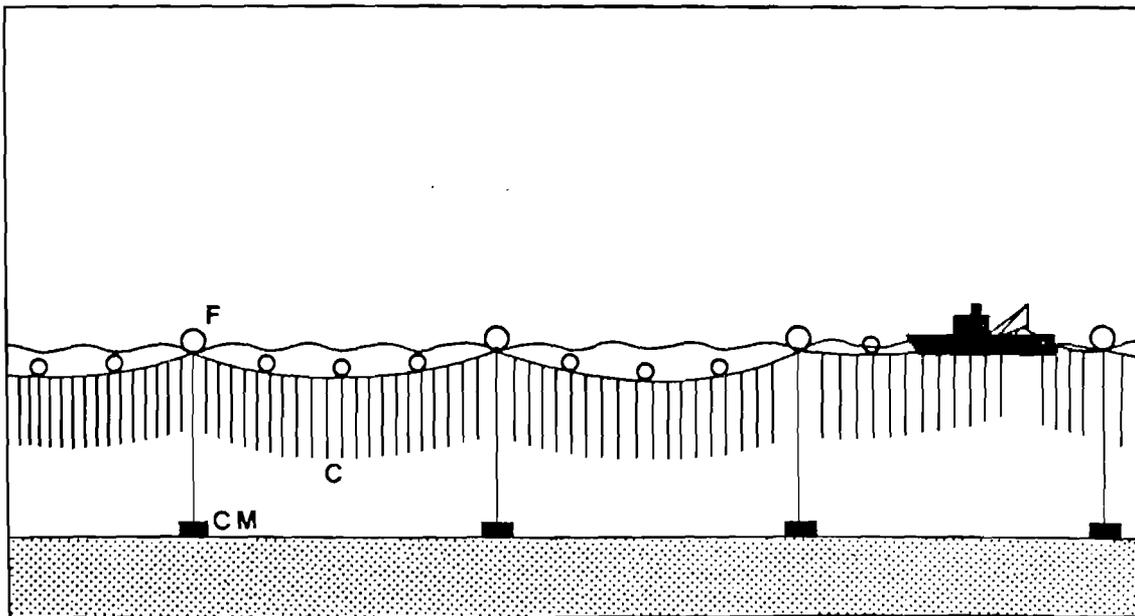


Figure 2: Schéma de principe d'une filière flottante.

CM: corps morts; F: flotteurs; C: cordes recouvertes de moules.

2) Caractérisation génotypique des mollusques:

Les génotypes de tous les individus des lots expérimentaux ont été déterminés pour les loci EST D, LAP, PGI, ODH, et MPI. Les individus pris en compte sont caractérisés sur l'ensemble des loci (86 individus provenant de Noirmoutier, 42 individus provenant de Saint Briec, et 90 provenant de Groix).

Le protocole d'analyse électrophorétique sur gel d'amidon est détaillé en annexe I.

3) Traitement des données:

L'absence de véritable système diagnostique entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* nous a amené à intégrer dans nos résultats les deux échantillons de référence (*M. edulis* du Danemark -Mer du Nord-, et *M. galloprovincialis* de France -Méditerranée) déjà utilisés dans le chapitre précédent. Les fréquences alléliques ont tout d'abord été calculées. Une analyse factorielle des correspondances a ensuite été appliquée sur l'ensemble des individus. Pour cela, chaque individu est caractérisé pour l'ensemble des Allèles par la valeur 2, 1, ou 0 suivant le nombre de copies de l'allèle considéré: 2 s'il est homozygote pour cet allèle, 1 s'il est hétérozygote, et 0 s'il ne présente pas cet allèle (She *et al.*, 1987). L'ensemble des génotypes est rassemblé dans un tableau (Individus x allèle) contenant la totalité des données brutes. Ces individus sont traités en variables actives par AFC. Les effectifs alléliques des échantillons (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, Noirmoutier, Groix, et St Briec) sont également intégrés au tableau et traités en variables supplémentaires. Ils constituent les centres de gravité de chaque échantillon. Ce traitement nous permet donc de visualiser, dans la même analyse, la variabilité génétique inter-échantillons (projection des centres de gravité), et intra-échantillons (projection des individus). La variable "parasitisme" n'est pas introduite dans l'analyse de façon à ne pas influencer la structuration du nuage de points qui doit uniquement rendre compte des caractéristiques génétiques des individus. Les individus sont identifiés manuellement sur la projection grâce à leur code (ex: "N35"=individu sain N° 35 provenant de Noirmoutier-N-; "G51P"=individu parasité-P-n° 51 provenant de Groix-G-).

Pour tester les différences génétiques entre deux échantillons ou sous-échantillons caractérisés lors de l'AFC, nous avons appliqué un test G (Sokal et Rohlf, 1969; Scherrer, 1984) sur les effectifs alléliques des échantillons.

Tableau 1: Fréquences alléliques des *M. edulis* de Mer du Nord (*M. ed*), des *M. galloprovincialis* de Méditerranée (*M. gal*), ainsi que des trois échantillons expérimentaux issus des populations de St Brieuc (SBR), Groix (GROIX) et Noirmoutier (NOIR.) (n = nombre de gènes échantillonnés).

		Allèles							
		n	1	2	3	4	5	6	7
EST.D	<i>M. gal</i>	112	.03	.93	0	.04	0		
	SBR	84	0	.81	0	.19	0		
	GROIX	180	.03	.62	.02	.31	.02		
	NOIR	172	0	.04	.02	.91	.03		
	<i>M. ed</i>	80	.01	0	.01	.98	0		
LAP	<i>M. gal</i>	112	0	.02	.05	.31	.01	.56	.05
	SBR	84	0	.05	.02	.47	.02	.42	.02
	GROIX	180	.03	.08	.02	.48	.01	.37	.01
	NOIR	172	.02	.09	.01	.66	.05	.16	.01
	<i>M. ed</i>	80	.01	.26	0	.53	.01	.16	.03
PGI	<i>M. gal</i>	112	0	0	.02	.78	.15	.05	0
	SBR	84	.01	.01	.05	.54	.25	.13	.01
	GROIX	180	0	.01	.05	.39	.32	.22	.01
	NOIR	172	0	.01	.05	.27	.19	.47	.01
	<i>M. ed</i>	80	0	.02	.05	.23	.18	.50	.02
ODH	<i>M. gal</i>	112	0	.09	.22	0	.69		
	SBR	84	.01	.47	.26	0	.26		
	GROIX	180	.01	.38	.41	0	.21		
	NOIR	172	.01	.07	.88	0	.04		
	<i>M. ed</i>	80	0	.05	.76	.01	.18		
MPI	<i>M. gal</i>	112	.96	.03	.01				
	SBR	84	.69	.31	0				
	GROIX	180	.61	.38	.01				
	NOIR	172	.02	.96	.02				
	<i>M. ed</i>	80	.04	.96	0				

RESULTATS:

1) Variabilité génétique inter et intra échantillon:

Le tableau I permet de comparer, aux cinq locus, les fréquences alléliques des 3 échantillons expérimentaux à celles des échantillons *M. edulis* et *M. galloprovincialis* de référence. L'ensemble de ces informations est visualisé grâce à la position des centres de gravité sur le premier plan de l'AFC (Fig 3). Les projections respectives des individus de Groix (Fig 3A), de St Brieuc et Noirmoutier (Fig 3B) confirment que l'ensemble des individus soumis à l'infestation parasitaire présentent une variabilité génétique représentative du complexe *M. edulis/M. galloprovincialis*. Nous observons en effet des individus typiquement *M. edulis* (échantillons de Noirmoutier et Groix), typiquement *M. galloprovincialis* (échantillons de S Brieuc et Groix), ainsi que de nombreux individus hybrides ou introgressés en position intermédiaire (essentiellement dans l'échantillon de Groix).

2) Caractérisation des génotypes infestés:

Les trois échantillons expérimentaux n'ont pas été touchés de façon identique par le trématode: l'échantillon de St Brieuc, majoritairement de type *M. galloprovincialis*, est indemne de parasite alors qu'un nombre significatif de moules de Groix et de Noirmoutier sont infestées. Sur la figure 3C sont distingués les individus sains et parasités des échantillons de Groix et Noirmoutier, ainsi que les centres de gravité des sous-échantillons correspondants: "Groix sains", Groix parasités", "Noirmoutier sains" et "Noirmoutier parasité". Les individus sains et parasités de Noirmoutier, de type *M. edulis*, ne présentent pas de différence significative dans leur fréquences alléliques (G test: $G^2 = 10,2$; ddl=19, $P > 0,05$). Ceci est traduit sur la figure 3C, par la projection presque superposée de leur centre de gravité. Par contre, dans l'échantillon de Groix, qui contient de nombreux individus introgressés, l'ensemble des génotypes des individus sains et celui des individus parasités sont significativement différents (G test: $G^2=73$; ddl=20; $P < 0,01$). Le centre de gravité des individus sains est projeté du coté négatif de l'axe I caractéristique de *M. galloprovincialis*, alors que le centre de gravité des individus parasités se situe du coté positif de l'axe I caractéristique de *M. edulis* (Fig 3C).

Afin de s'assurer que la position du centre de gravité des 15 individus parasités de Groix, situé en "zone *M. edulis*" sur la projection, ne peut pas être expliquée par le

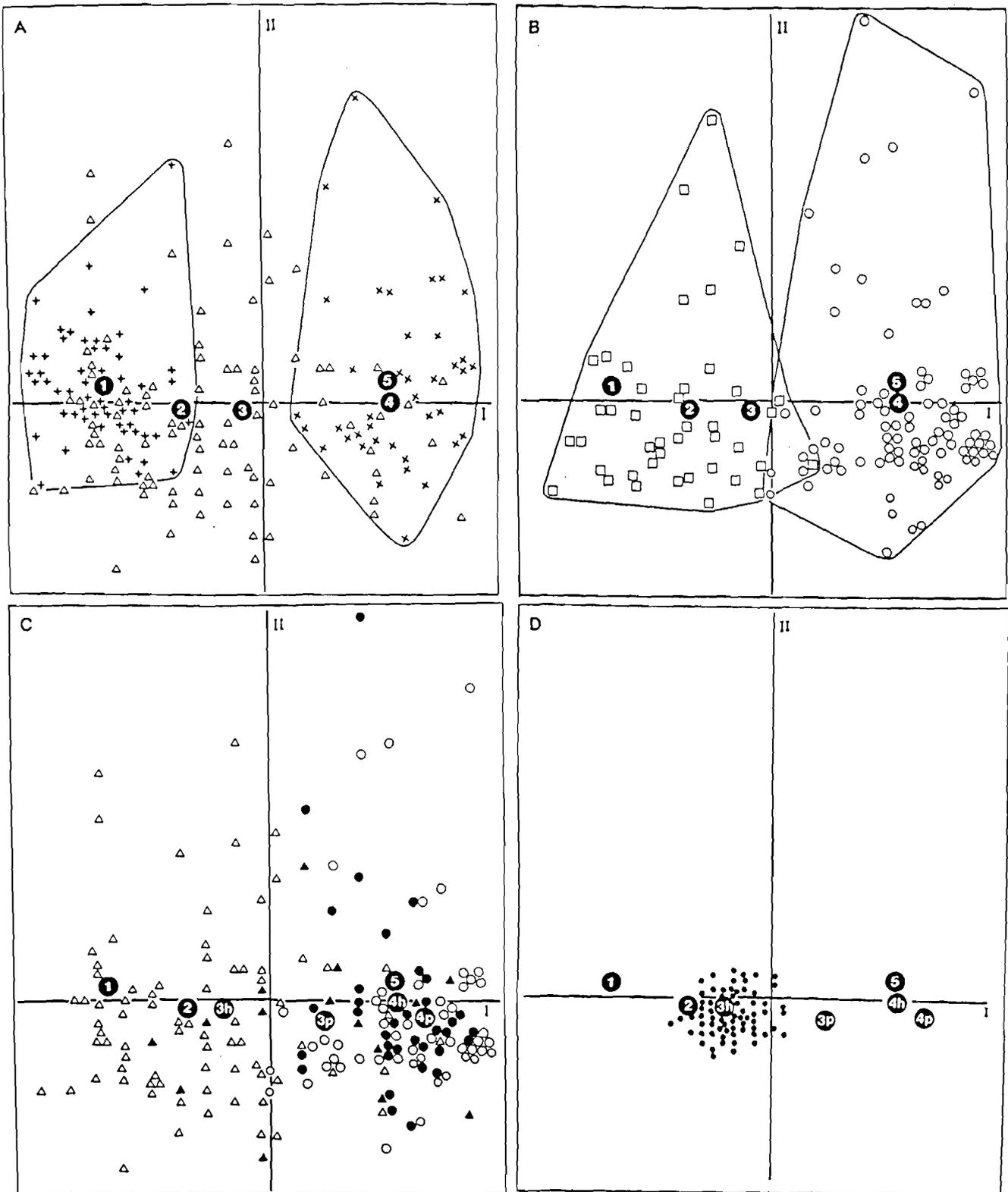


Figure 3: Projection sur le premier plan de l'analyse factorielle des correspondances des 314 individus issus des échantillons de Méditerranée (*M. galloprovincialis*) (1), St Brieuc (2), Groix (3), Noirmoutier (4), et Mer du Nord (*M. edulis*) (5). Les centres de gravité des échantillons sont représentés par le numéro de l'échantillon. **A:** Projection des *M. galloprovincialis* (+), *M. edulis* (x), et des individus de Groix (Δ). **B:** Projection des individus de St Brieuc (□) et Noirmoutier (○). **C:** Projection des individus de Groix (Δ) et Noirmoutier (○) avec distinction des individus sains (Δ○) et parasités (▲●). Les centres de gravité des sous échantillons correspondants sont identifiés par 3h = Groix sain, 3p = Groix parasité, 4h = Noirmoutier sain, et 4p = Noirmoutier parasité. **D:** Projection des centres de gravité obtenus par tirage au hasard de 15 génotypes parmi les 90 génotypes de Groix (●). 66 sont représentés et 34 sont superposés.

hasard, nous avons simulé un tirage au hasard de la façon suivante. Quinze génotypes sont tirés au hasard sans remise parmi les 90 génotypes de l'échantillon de Groix, puis leur centre de gravité est calculé (comptage des effectifs alléliques). Cette opération est renouvelée 100 fois, et les 100 centres de gravité obtenus sont traités en éléments supplémentaires dans la même AFC que précédemment (Fig 3D). Aucun des centres de gravité simulés ne présente des caractéristiques génétiques similaires au centre de gravité observé (Fig 3D). Ceci confirme le caractère non aléatoire de l'association "parasite-génotype *M. edulis*" que nous observons au sein de l'échantillon de Groix.

DISCUSSION:

* Le nombre et le type de taxons hôtes que l'on observe pour un parasite donné dépend de trois principaux facteurs (Euzet et Combes, 1980):

i) la limite de biocénose, ii) le filtre éthologique, iii) et l'angle d'exigence du parasite qui reflète l'ensemble des propriétés physiologiques du biotope hôte nécessaire au développement du parasite. L'importance des deux premiers facteurs, qui regroupent l'ensemble des caractéristiques spatiales et temporelles permettant la rencontre hôte-parasite a par exemple été montré dans un travail récent sur les monogènes des barbeaux *Barbus barbus*, *B. meridionalis* et de leurs hybrides (Le Brun, 1989). La prévalence de *Diplozoon gracile*, nulle chez *B. barbus*, augmente proportionnellement avec l'introgession par *B. meridionalis*. Ce résultat s'explique par les différences de comportement et d'habitats des deux espèces, entraînant directement des différences dans les probabilités de rencontre du parasite.

Dans notre travail, tous les individus ont eu la même probabilité de rencontre du parasite. En effet, l'ensemble des mollusques a été exposé à l'infestation parasitaire dans un même lieu, et durant une même période. Seules les moules présentant un génotype *M. edulis*, "pur" ou introgressé, ont été infestées. Il est donc certain que la parasitose différentielle que nous observons au sein du complexe *Mytilus* est liée à des particularités du génome hôte n'intervenant pas dans la probabilité de rencontre hôte-parasite, mais dans ce que nous appellerons la compatibilité hôte-parasite.

- Ouvrons ici une parenthèse sur les termes utilisés: le succès d'une infestation parasitaire peut être interprété en termes "d'angle d'exigence" du parasite, ou bien de "susceptibilité/résistance" de l'hôte selon l'optique "hôte ou parasite" adopté par

l'auteur de l'étude. Nous emploierons ici le terme de compatibilité hôte-parasite qui rend mieux compte de l'aspect interactif de la relation.-

Un polymorphisme géographique de compatibilité pourrait être évoqué. Un tel polymorphisme a été mis en évidence au sein du système *Schistosoma japonicum/Oncomelania hupensis* (Xia, 1990). Le succès des infestations homopatriques (souches hôte et parasite issues de la même localité) est supérieur à celui des infestations allopatriques (souches issues de localités différentes).

Ce type de différenciations géographiques peut également exister au sein du système *Mytilus/Prosorhynchus*. Ceci introduirait un biais dans nos résultats puisque les deux formes parentales proviennent de localités différentes du site d'infestation. Cependant, la population hybride (moules de Groix) et la population de trématodes sont homopatriques. De ce fait, la susceptibilité différentielle observée au sein même de l'échantillon de Groix ne peut pas être un artefact du à l'allopatrie hôte/parasite.

Bien que génétiquement très proches (Skibinski *et al.*, 1980; Edwards et Skibinski, 1987; Varvio *et al.*, 1988), *M. edulis* et *M. galloprovincialis* présentent donc certaines différences intervenant dans leur compatibilité avec *P. squamatus*.

* La compatibilité implique la réussite de l'infestation à deux niveaux d'interaction:

i) les interactions immunitaires: il faut que le parasite puisse franchir la barrière du système de défense interne de l'hôte (Jourdan, 1982; Loker, 1986; van der Knaap et Loker, 1990);

ii) et les interactions liées au développement du parasite: celui-ci doit trouver dans son hôte toutes les conditions physico-chimiques nécessaires à son développement.

Les travaux réalisés sur le système de défense interne des gastéropodes ont montré l'importance et la variabilité des interactions immunitaires dans les systèmes trématode/gastéropode. Par contre, chez les gastéropodes, il n'existe pas, à notre connaissance, d'exemple connu de trématode accepté par le système de défense interne du mollusque, et incapable de se développer dans cet hôte.

Nous avons montré qu'en milieu naturel, les individus *M. edulis* pouvaient être infestés à partir du mois de d'Aout (annexe II), alors que les sporocystes ne sont observés qu'à partir du mois de Janvier, période où débute la gamétogenèse de l'hôte. L'infestation semble donc débiter par une phase de latence durant laquelle le parasite ne se développe pas ou peu. Au terme de cette période, la phase de multiplication est probablement initiée par un "signal" physiologique ou endocrinien. Rien ne nous permet

d'affirmer que les particularités de *M. galloprovincialis* responsables de sa non compatibilité ne soient pas, justement, liées à ce "signal".

Le système *P. squamatus/Mytilus* ne nous permet ni d'analyser les interactions immunitaires, ni de suivre dans le temps les interactions liées au développement de *P. squamatus*, car nous ne pouvons pas réaliser d'infestation expérimentale de *Mytilus*. Par contre, certaines interactions biochimiques peuvent être abordées, et nous en décrivons une approche *in vitro* dans les chapitres 4, et 5.

* En conclusion, nos résultats montrent qu'au sein du complexe *M. edulis/M. galloprovincialis*, la susceptibilité au trématode *P. squamatus* est liée aux caractéristiques génétiques d'une seule des formes parentales: *M. edulis*. Etant donné l'effet pathogène marqué de ce trématode, sa présence dans les sites de sympatrie constitue une source de pressions sélectives différentielles agissant contre *M. edulis*.

Des pressions de sélection agissant contre *M. edulis* ont été mises en évidence dans des travaux sur la structure génétique et démographique de populations hybrides des côtes britanniques (Skibinski, 1983, Gardner et Skibinski, 1988). Seuls des facteurs abiotiques ont été invoqués pour expliquer ces résultats.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le facteur "parasitisme", au même titre que les facteurs abiotiques, mérite d'être pris en compte dans l'étude des interactions entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

Les études quantitatives du parasitisme en zone hybride (Sage *et al.*, 1986; Whitham, 1989; Moulia *et al.*, *ss presse*) montrent que le parasitisme peut participer au maintien de l'isolement des deux taxons hôtes en contre sélectionnant les hybrides. En revanche, dans le cas de *Mytilus*, nos travaux montrent qu'il est susceptible d'influencer la structure génétique des populations naturelles en faveur du taxon compétiteur non compatible.

**STRUCTURE DES ASSOCIATIONS PARASITE / GENOTYPE
HOTE AU SEIN D'UNE POPULATION DE *MYTILUS EDULIS*.**

CHAPITRE III

STRUCTURE DES ASSOCIATIONS PARASITE/GENOTYPE HOTE AU SEIN D'UNE POPULATION DE *MYTILUS EDULIS*.

INTRODUCTION:

Dans le chapitre précédent nous avons caractérisé un groupe de génotypes hôtes susceptibles parmi un ensemble de génotypes dont la variabilité couvre celle du complexe *M. edulis/galloprovincialis*. Nous allons maintenant rechercher s'il existe des associations particulières entre génotypes hôtes et parasites, au sein d'un ensemble de génotypes hôtes beaucoup plus homogène correspondant aux individus d'une population typiquement *M. edulis*.

Un polymorphisme de compatibilité intrapopulationnel a été mis en évidence au sein de systèmes insecte/parasitoïde. Bouletreau (1986) montre que le succès du développement des larves de *Leptopilina heterotoma* varie de 5 à 80% selon les familles d'hôtes drosophile, alors que celles-ci sont réalisées en laboratoire à partir d'individus prélevés dans une même population.

Un tel polymorphisme de compatibilité est très difficile à mettre en évidence au sein de populations naturelles. En effet, si ce phénomène existe, il ne sera perçu que si les marqueurs génétiques utilisés sont liés au(x) gène(s) impliqué(s) dans le mécanisme de compatibilité.

Nous réalisons donc cette approche en augmentant le nombre d'individus et de marqueurs génétiques analysés, et en utilisant des méthodes d'analyse de données plus approfondies.

L'une des caractéristiques génotypiques que nous avons étudié est l'hétérozygotie multilocus.

Les déficits en hétérozygotes observés fréquemment dans les populations naturelles de bivalves (Zouros et Foltz, 1984), et leur variabilité en fonction des populations, de l'âge ou de la taille des individus (Zouros *et al.*, 1980; Gaffney, 1990) ont motivés de nombreux travaux mettant en relation l'hétérozygotie et la croissance (Koehn et Gaffney, 1984; Rodhouse *et al.*, 1986; Scott et Koehn, 1990; Alvarez *et al.*,

1989; Gosling, 1989), l'hétérozygotie et la production de gamètes (Rodhouse *et al.*, 1986), l'hétérozygotie et la viabilité (Beaumont *et al.*, 1983; Mallet et Haley, 1984), ou l'hétérozygotie et les performances métaboliques (Diehl *et al.*, 1985; Zouros *et al.*, 1988). Bien que certains de ces résultats soient contradictoires (Zouros et Foltz, 1987; Alvarez *et al.*, 1989) la tendance générale des observations suggère:

- 1) une moins bonne valeur adaptative des hétérozygotes en phase prérecrutée, probablement à l'origine des déficits en hétérozygotes dans les classes de jeunes individus fixés (Mallet *et al.*, 1985; Blanc et Bonhomme, 1987),
- 2) une balance énergétique plus avantageuse, en phase postrecrutée, pour les individus les plus hétérozygotes lorsqu'ils sont soumis à des conditions de stress environnemental (Koehn et Shumway, 1982; Hawkins *et al.*, 1986; Blanc et Bonhomme, 1987; Koehn et Bayne, 1989; Scott et Koehn, 1990).

Si les performances métaboliques en condition de stress environnemental sont corrélées au taux d'hétérozygotie, il est légitime de s'interroger sur la relation entre hétérozygotie et performances en condition de stress biotique tel que l'infestation parasitaire. Afin de réaliser une première approche de cette étude, nous analysons la relation entre hétérozygotie multilocus et présence du parasite.

Nous analysons successivement dans ce chapitre, l'association entre présence du parasite et:

- i) présence d'allèles particuliers,
- ii) combinaisons d'allèles,
- iii) hétérozygotie multilocus.

MATERIEL ET METHODES:

1) Prélèvements:

Les individus ont été prélevés au sein d'une population naturelle à Agon-Coutainville (Ouest Cotentin) (Fig 2 Chap I).

La présence de *P. squamatus* est déterminée lors de la dissection sous la loupe binoculaire, puis les portions de muscle et de glande digestive sont prélevées en vue de l'analyse électrophorétique.

2) Analyse du polymorphisme enzymatique:

Nous avons analysé ici les cinq systèmes déjà cités EST D, LAP, PGI, ODH, et MPI, ainsi que deux autres systèmes enzymatiques polymorphes IDH (Isocitrate déshydrogénase) et PGM (Phosphoglucomutase)(annexe 1). Seuls les individus caractérisés sur l'ensemble des loci sont pris en compte dans les résultats (140 individus).

3) Traitements des données:

Nous utilisons dans ce chapitre des tests ou traitement des données déjà utilisés dans les chapitres précédents, ainsi que d'autres outils statistiques particulièrement adaptés aux données qualitatives.

* La relation entre présence du parasite et présence d'un allèle particulier est testée grâce au coefficient de corrélation de points ϕ (Dagnelie, 1973). Ce coefficient s'applique pour tester la corrélation entre deux variables qualitatives ayant chacune deux modalités.

Dans notre cas, le test est réalisé sur le tableau:

		Parasite	
		présent	absent
Allèle X	présent	a	b
	absent	c	d

$$\phi = \frac{ad - bc}{[(a+b)(b+d)(d+c)(c+a)]^{1/2}}$$

a, b, c, et d étant des effectifs.

Ce coefficient varie de -1 à 1 et sa valeur est proche de 0 lorsqu'il n'y a pas d'association particulière entre les variables. Sa valeur peut être testée par un X^2 car $X^2 = \phi^2 \cdot N$,

N = effectif total (Dagnelie, 1973). Ce test est réalisé sur chaque allèle fréquent ainsi que sur les allèles rares regroupés entre eux pour chaque locus.

* La relation entre parasitisme et combinaison allélique est analysée par l'emploi successif d'une AFC puis d'une classification ascendante hiérarchique (CAH) du moment d'ordre deux. L'AFC est réalisée sur l'ensemble du tableau (individu x allèle), les variables étant codées de la même façon qu'au chapitre II. Les coordonnées

Tableau I: Fréquences alléliques des sous échantillons d'individus sains (S) et parasités (P) prélevés à Agon-Coutinville. Le nombre de gènes analysés aux 7 locus est de 176 chez les individus sains et de 104 chez les individus parasités,

		Allèles						
		1	2	3	4	5	6	7
EST D	S	0.01	0.02	0	0.96	0.01		
	P	0	0.03	0.01	0.93	0.03		
LAP	S	0.02	0.13	0	0.61	0.01	0.22	0.01
	P	0.02	0.01	0	0.70	0.02	0.15	0
PGI	S	0	0	0.05	0.29	0.07	0.56	0.03
	P	0	0.01	0.01	0.35	0.05	0.55	0.03
ODH	S	0	0.09	0.85	0.05	0.01		
	P	0	0.07	0.87	0.06	0		
MPI	S	0.07	0.92	0.01				
	P	0.06	0.91	0.03				
IDH	S	0.13	0.01	0.86				
	P	0.15	0	0.85				
PGM	S	0.02	0.24	0.74				
	P	0.05	0.24	0.71				

Tableau II: Valeurs des coefficients de corrélation \emptyset entre "allèles" et "présence du parasite". Le symbole r indique qu'il s'agit d'allèles rares regroupés. Aucune valeur n'est significative au seuil de 0.05.

EST D	4	+0.04	ODH	2	+0.03
"	r	-0.04	"	3	-0.03
LAP	2	+0.04	"	r	+0.01
"	4	-0.04	MPI	2	+0.02
"	6	+0.07	"	r	-0.02
"	r	-0.03	IDH	3	-0.03
PGI	4	-0.07	"	r	+0.03
"	5	-0.01	PDH	3	+0.02
"	6	+0.01	"	r	-0.02
"	r	+0.07			

des individus sur les 6 premiers axes factoriels sont gardées en mémoire et sont utilisées pour réaliser la CAH (Roux, 1985).

Cette procédure permet, lors de l'AFC, de transformer l'information contenue dans les 26 variables qualitatives utilisées (=26 allèles) en 6 variables quantitatives non corrélées entre elles. Ensuite, la CAH regroupe les individus en classes de façon à ce que les moments intra-classe (=la dispersion intra-classe) soient les plus petits possibles. Dans le cas de nos données, les classes correspondront donc à des groupes d'individus présentant les combinaisons alléliques les plus proches.

* **L'hétérozygotie multilocus** est mesurée pour chaque individu par le nombre de locus à l'état hétérozygote sur les 7 locus. Les individus présentant le même nombre de locus à l'état hétérozygote sont regroupés, puis un test G est réalisé sur les distributions des individus sains et parasités en fonction des classes d'hétérozygotie.

RESULTATS:

1) Relation entre présence du trématode et présence d'un allèle particulier:

Le tableau I montre les fréquences alléliques aux 7 locus des sous-échantillons d'individus sains et parasités. La différence entre les distributions alléliques de ces deux sous échantillons, mesurée sur l'ensemble des 7 locus n'est pas statistiquement significative (test G: $G=12,9$; $ddl=18$; $P \gg 0.05$).

Les résultats du tableau II indiquent qu'il n'y a aucune corrélation significative entre le parasitisme et un allèle particulier.

2) Relation entre parasitisme et combinaison allélique:

L'AFC (Fig 1) met en évidence une grande homogénéité génétique entre les 140 individus. L'absence de structure du nuage de points est confirmée par les faibles pourcentages d'inertie des 6 premiers axes factoriels qui sont respectivement de 9.2, 8.2, 8, 7.2, 7, et 5.9. Les individus s'écartant de l'origine présentent des allèles rares tels que Est D 5, Lap 3, Lap 5, Pgi 3, Odh 1, etc..

La variable "parasitisme" traitée en élément supplémentaire se projeté pratiquement au centre du nuage de points. Aucune association particulière ne peut donc être détectée par cette analyse.

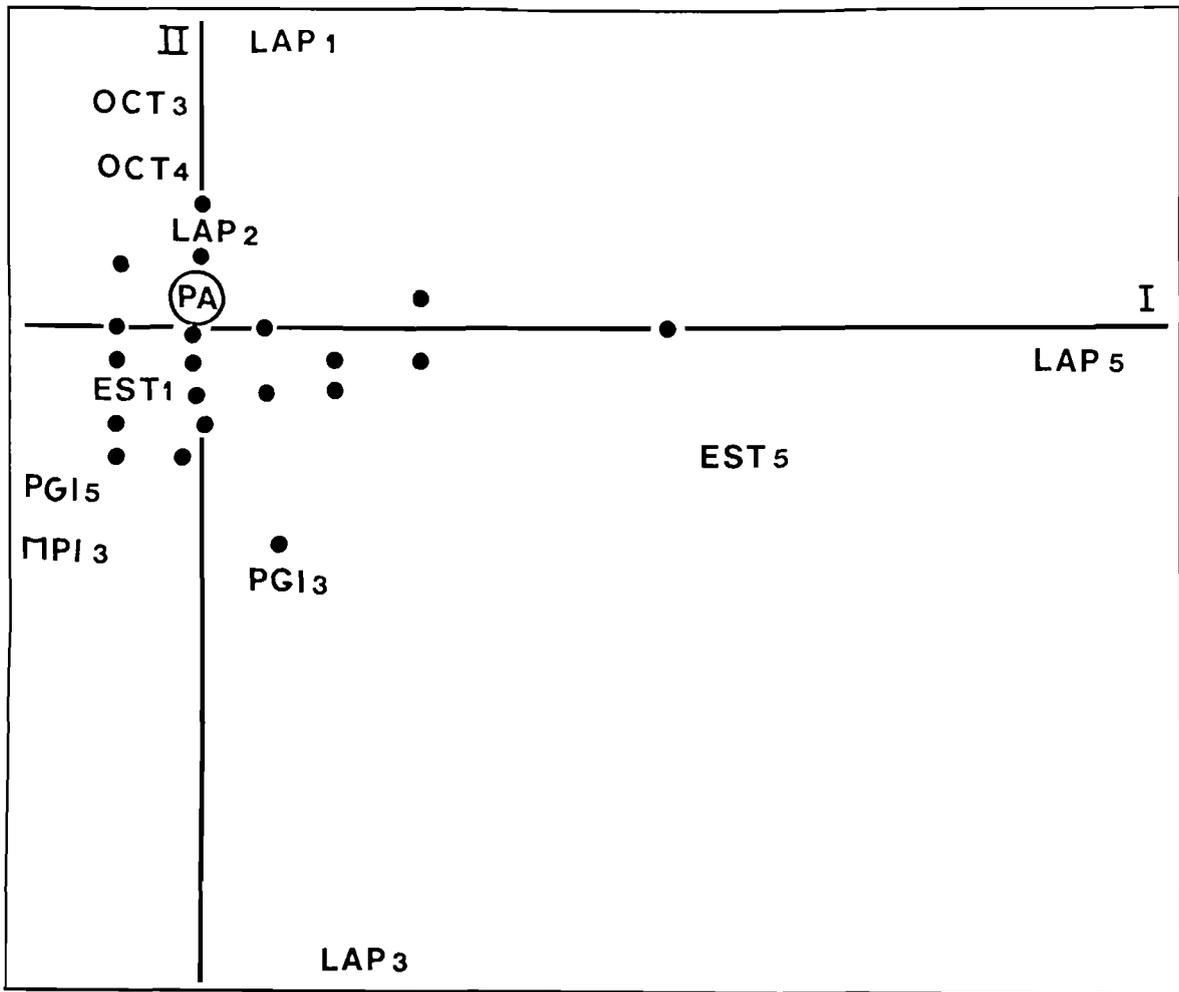


Figure 1: Projection sur le premier plan de l'AFC des 140 points individus de l'échantillon d'Agon-coutainville, des 26 variables actives ainsi que de la variable supplémentaire "parasitisme" (PA). 32 points sont représentés, 134 sont superposés.

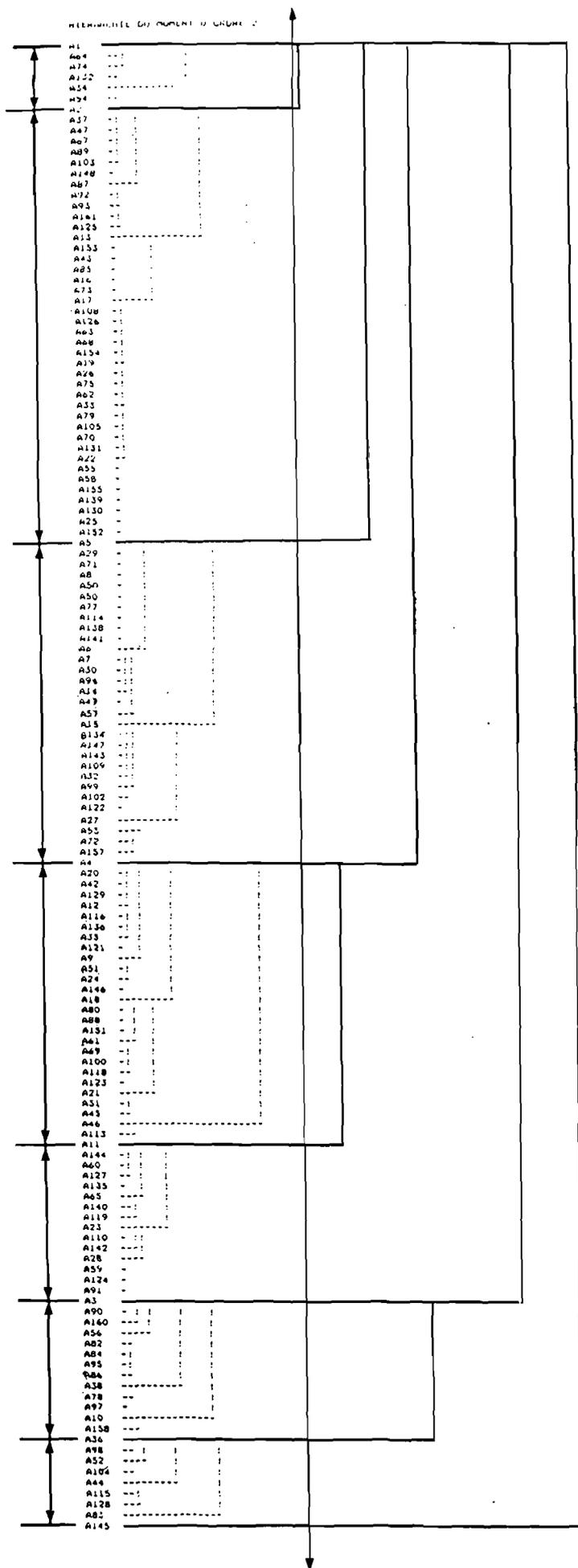


Figure 2: Classification ascendante hiérarchique obtenue à partir des coordonnées des 140 individus aux 6 premiers axes de l'AFC de la figure 1. Le niveau de troncature est indiqué par la double flèche.

Tableau III: Fréquences alléliques et prévalences parasitaires (P%) des 7 classes d'individus obtenues par la CAH. n = nombre de gènes.

	n	Classes						
		1	2	3	4	5	6	7
		12	81	58	54	30	26	16
EST D	1	--	--	--	0.04	--	--	--
	2	--	--	0.12	--	--	--	--
	3	--	0.01	--	--	--	--	--
	4	0.66	0.99	0.88	0.96	1	1	1
	5	0.33	--	--	--	--	--	--
LAP	1	--	--	--	--	0.20	--	--
	2	--	0.01	0.05	0.39	0.10	0.11	0.06
	3	--	--	--	--	--	--	0.06
	4	0.75	0.83	0.62	0.50	0.43	0.65	0.69
	5	0.16	--	--	--	--	--	--
	6	0.09	0.15	0.32	0.11	0.27	0.24	0.19
	7	--	0.01	0.01	--	--	--	--
PGI	1	--	0.01	--	--	--	--	--
	2	--	--	0.02	0.02	--	--	--
	3	0.09	--	0.02	--	--	--	0.50
	4	0.25	0.27	0.55	0.26	0.40	0.11	0.06
	5	--	--	--	0.02	--	0.57	0.06
	6	0.57	0.72	0.41	0.65	0.53	0.31	0.26
	7	0.09	--	--	0.05	0.07	--	0.12
ODH	1	0.09	0.02	0.04	0.016	--	0.11	--
	2	0.91	0.98	0.96	0.84	0.60	0.74	0.62
	3	--	--	--	--	0.04	--	--
	4	--	--	--	--	0.36	0.11	0.07
	5	--	--	--	--	--	0.04	--
MPI	1	0.09	--	0.17	0.04	--	0.11	0.18
	2	0.91	0.96	0.83	0.96	1	0.86	0.82
	3	--	0.04	--	--	--	0.03	--
IDH	1	0.09	0.28	0.09	0.02	0.03	0.27	0.07
	2	--	0.02	--	--	--	--	--
	3	0.91	0.70	0.91	0.98	0.97	0.73	0.93
PGM	1	--	--	0.13	--	--	--	--
	2	0.09	0.17	0.31	0.27	0.30	0.31	0.18
	3	0.91	0.83	0.66	0.73	0.70	0.69	0.82
P%		33	44	45	26	46	30	0

La CAH appliquée aux coordonnées des individus sur les 6 premiers axes de l'AFC fournit une arborescence (Fig 2) dans laquelle on peut distinguer 7 principales classes d'individus, plus une 8^e formée d'un individu unique à génotype rare. Le nombre de classes observées dépend évidemment du niveau de troncature qui est lui-même fixé arbitrairement. Nous avons choisi le niveau correspondant à un compromis entre des classes nombreuses à effectif réduit et peu de classes d'effectif important (Fig 2). Si l'on recalcule les fréquences alléliques de ces 7 classes d'individus (la 8^e classe formée d'un individu unique est éliminée)(Tab III) on remarque des différences, en particulier en ce qui concerne les allèles peu fréquents. La classe 1, par exemple, peut être distinguée des autres classes par ses fréquences d'allèles Est D 5 et Lap 5, alors que la classe 4 s'écarte des autres classes au niveau des allèles Est D 1 et Lap 2 (Tab. III). Les différences que nous observons dans ce tableau ne peuvent cependant pas être testées car trop d'allèles sont peu, ou pas, représentés. La réalisation d'un test nécessiterait de regrouper les allèles jusqu'à n'obtenir qu'un allèle synthétique par locus.

Par contre, nous pouvons tester les différences entre les prévalences parasitaires des 7 classes (Tab. III) par un test G appliqué aux effectifs d'individus sains et parasités : $G=11,45$; $ddl=6$; $0.1 > P > 0.05$.

Cette valeur de G, bien qu'élevée, n'est pas significative au seuil de 0,05. Cependant, le test G est très robuste mais peu puissant. Il est donc nécessaire de tester la validité de ces résultats, et en particulier, de savoir comment se situe l'hétérogénéité observée par rapport à une hétérogénéité engendrée par le hasard dans le même tableau.

Pour cela, les 139 individus constituant les 7 classes sont permutés aléatoirement (Mathieu 1990). Les effectifs d'individus sains et parasités sont recomptés dans chaque classe puis la variable G est calculée. Sur 30 simulations, la valeur de G varie de 1 à 23, avec une moyenne de 7,3 (notons que la valeur 23 est très hautement significative - $P < 0,001$ - alors qu'elle est engendrée par un tirage au hasard). L'hétérogénéité que nous observons au niveau de la distribution du parasite dans les 7 classes d'individus peut donc être totalement due au hasard.

3) Relation entre présence du parasite et hétérozygotie multilocus:

Le nombre moyen de locus à l'état hétérozygote calculé sur les 7 locus est de 2,22 ($s=1.10$) pour l'ensemble des individus sains, et de 2,21 ($s=1.09$) pour l'ensemble des individus parasités.

Lorsque l'on compare les **distributions des hétérozygotes multilocus** chez les individus sains et parasités, aucune différence significative n'est mise en évidence (Tab. IV), (G test: $G= 0,71$; $ddl=4$; $P>>0,05$).

Tableau IV: Distribution des individus sains (**S**; $n=88$) et parasités (**P**; $n=52$) en fonction du nombre de locus à l'état hétérozygote (**H7**) mesuré sur 7 locus.

H7	0	1	2	3	4	5	6	7
S	3	19	34	22	8	1	1	0
P	2	13	16	14	7	0	0	0

DISCUSSION

Lors de cette analyse des associations "génotype hôte/parasite" nous n'avons pu mettre en évidence aucune association particulière.

Toutefois, ce résultat ne nous permet pas de conclure qu'il n'existe pas de polymorphisme de compatibilité intra-populationnel car, rappelons-le, cette approche est limitée par différents facteurs:

- Contrairement aux expérimentations en laboratoire, tous les individus n'ont probablement pas été en contact avec le parasite, ce qui introduit un biais dans les résultats;
- S'il existe un polymorphisme de compatibilité à déterminisme génétique, il doit présenter un déterminisme simple pour être perçu par une analyse génétique;
- Enfin et surtout, les marqueurs génétiques que nous utilisons doivent être liés au(x) gène(s) déterminant la compatibilité.

Nous soulignerons cependant l'intérêt méthodologique de ce travail. En effet, les analyses utilisées semblent assez performantes pour l'étude des associations génotype hôte/parasite, ou même génotype hôte-génotype parasite, étant donnée la nature qualitative des données. Ce type de traitement, encore peu utilisé en génétique des populations permet de détecter des structures génétiques beaucoup plus fines que ne le font les analyses classiques (Berrebi, 1988; Mathieu, 1990).

Elles doivent pouvoir trouver leur application en parasitologie, et donner de bons résultats en particulier dans deux cas:

- i) lorsque le génome hôte (et/ou le génome parasite) est déjà bien connu et peut être caractérisé au niveau de nombreux marqueurs nucléaires,
- ii) lorsque les associations hôte-parasite peuvent être testées en laboratoire .

**ANALYSE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA
CASTRATION PARASITAIRE - APPROCHE *IN VITRO* -**

CHAPITRE IV

ANALYSE DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA CASTRATION PARASITAIRE - APPROCHE *IN VITRO* -

INTRODUCTION

Le développement du stade larvaire des trématodes au sein de leur premier hôte intermédiaire mollusque s'accompagne très généralement d'une castration de l'hôte (Laukner, 1980).

La castration parasitaire est définie par Malek et Cheng (1974) comme "l'inhibition partielle ou totale de la formation des gamètes hôtes". Elle peut résulter d'actions physiologiques (Cheng *et al.*, 1973), ou bien physiques (mécaniques)(Cheng et Cooperman, 1964) telles que l'ingestion des gonades hôtes par les rédies du parasite. Dans les deux cas, le parasite peut agir directement (Pearson et Cheng, 1985) ou indirectement (Johnston *et al.*, 1982; Cheng *et al.*, 1983; Joosse et Van Elk, 1983; De Jong-Brink *et al.*, 1986) sur les gonades de l'hôte. Un grand nombre d'hypothèses ont été proposées sur ces mécanismes d'action (Sullivan *et al.*, 1985), mais elles ont rarement pu être vérifiées.

En ce qui concerne *M. edulis*, rapellons que les observations histologiques de manteaux infestés par *P. squamatus* (cf "Présentation du matériel") ne montrent aucun phénomène de lyse ou de destruction mécanique, et suggèrent un blocage précoce de la gamétogenèse. Différents mécanismes peuvent induire une castration précoce, et il est nécessaire, avant de les exposer, de présenter brièvement la physiologie de la reproduction de *M. edulis*.

Ce bivalve présente un cycle de reproduction annuel. En été durant le repos sexuel, des réserves nutritionnelles sont constituées et stockées dans le tissu de réserve. La gamétogenèse s'effectue en hiver, et au début du printemps, au dépend de ces réserves (Gabbott, 1975; Lubet, 1976). Le tissu de réserve est composé de deux types cellulaires: les cellules adipogranuleuses et les cellules à glycogène. Ces dernières

accumulent de grandes quantités de glycogène qui sont mobilisées (glycogénolyse + transport) progressivement et servent de source énergétique à la gamétogenèse.

Ces deux cycles saisonniers étroitement reliés sont contrôlés par les ganglions cérébroïdes du bivalve. La gamétogenèse est déclenchée par un facteur activateur des mitoses goniales (FAMG) sécrété par les ganglions cérébroïdes (Mathieu *et al.* 1988), qui est actif durant la période de maturation sexuelle (entre Septembre et mars, en Normandie). Les mitoses goniales semblent être bloquées au moment de la maturité sexuelle (Mathieu *et al.*, 1982), mais le mécanisme impliqué dans l'arrêt des mitoses est inconnu. La mobilisation du glycogène est stimulée par un second facteur d'origine cérébrale, l'hormone mobilisatrice de glycogène (HMG) (Robbins *et al.*, 1990, *ss presse*).

Les cycles de gamétogenèse et de stockage/mobilisation de réserves étant intimement liés, il est clair que la castration parasitaire peut résulter (Fig. 1) d'une action de *P. squamatus*:

- i) sur l'un et/ou l'autre de ces cycles,
- ii) sur leur contrôle endocrine.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de cette castration parasitaire nous analysons, d'une part l'effet d'extraits de parasite sur les mitoses goniales et la mobilisation du glycogène, et d'autre part les conséquences de l'infestation parasitaire sur la sécrétion des FAMG et HMG par les ganglions cérébroïdes de l'hôte.

MATERIEL ET METHODES:

1) Animaux:

Les moules adultes *M. edulis* (4-5 cm de long) proviennent d'élevages sur bouchots situés dans l'ouest-Cotentin, où le trématode est présent. Les prélèvements et expérimentations sont réalisés au cours des mois de Janvier, Février et Mars. Cette période de l'année est imposée par la coïncidence des cycles d'activité gamétogénétique de l'hôte (Lubet et Mathieu, 1982) et de développement du parasite.

Les bivalves destinés à la préparation des extraits sont immédiatement disséqués sous la loupe binoculaire. Ceux utilisés pour les bioessais sont maintenus durant un à deux jours dans de l'eau de mer filtrée contenant des antibiotiques (Penicilline, 50000

*Action sur la sécrétion des
facteurs endocrines*

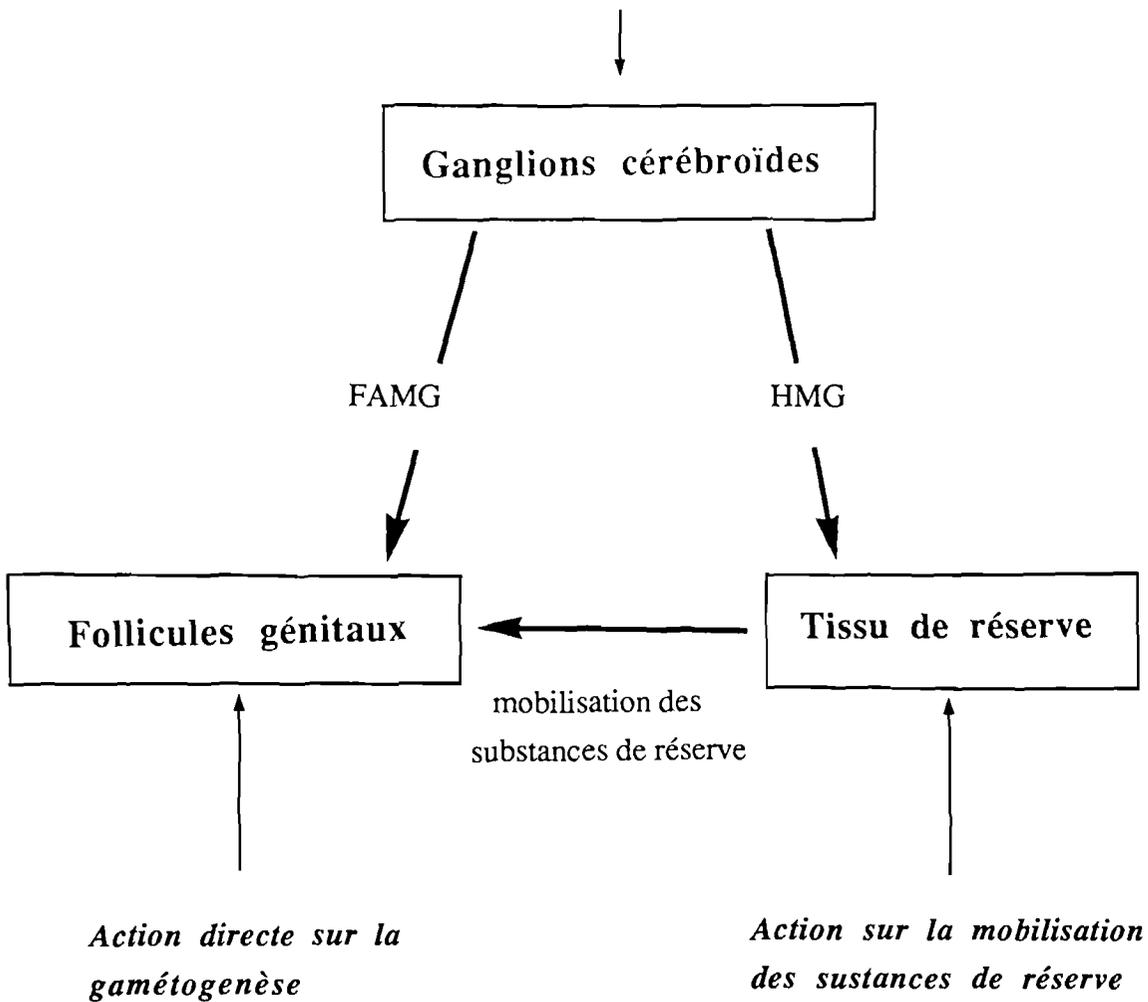


Figure 1: Schéma de principe du contrôle endocrine de la reproduction chez *M. edulis* et des niveaux d'action possibles de *P. squamatus*.

IU/l; Aureomycine 30 mg/l). Ils sont examinés au moment de l'expérimentation, et seuls les individus indemnes de parasite sont retenus (afin d'alléger le texte nous utiliserons le terme "sain" pour "non infesté par *P. squamatus* ou un autre parasite métazoaire").

2) Bioessais:

Nous utilisons dans ce travail deux bioessais spécifiquement adaptés à l'étude des contrôles endocrines de la gamétogenèse et de la mobilisation du glycogène chez *M. edulis* (Lenoir *et al.*, 1986; Lenoir *et al.*, 1989).

a) **L'activité gamétogénétique** est estimée par le taux d'incorporation de [H^3]-thymidine par des cellules dissociées de manteau (Mathieu *et al.*, 1988). L'utilisation de cellules dissociées, et non pas de cultures organotypiques ou d'animaux expérimentaux *in toto*, est justifiée par trois particularités du modèle:

- i) la gonade n'est pas un organe différencié, mais elle est constituée de tubules gonadiques qui envahissent progressivement le tissu de réserve du manteau;
- ii) lorsque les marqueurs radioactifs sont injectés ils diffusent de façon irrégulière au sein de l'individu;
- iii) il existe une hétérogénéité dans les stades sexuels des individus d'une même population d'une part, et des différentes parties du manteau d'un même individu d'autre part.

Bien que les suspensions contiennent tous les types cellulaires normalement présents dans le manteau (cellules germinales, cellules du tissu de réserve, cellules circulantes, etc.), seules les gonies se divisent et incorporent de la thymidine exogène durant la période d'incubation (Mathieu *et al.*, 1988); le taux d'incorporation de [H^3]-thymidine étant lié à la synthèse d'ADN. Ces suspensions homogènes de cellules permettent donc de tester des effets quantitatifs de façon reproductible.

Le manteau de moules non infestées est dissocié par deux incubations successives de 20 mn dans un milieu isosmotique à base de Hank 199 contenant 0,1 % de pronase. Il est ensuite passé sur une toile à bluter de 100 μ m de diamètre de maille. La suspension de cellules obtenue est lavée par une double centrifugation (800 G, 4 mn). Les cellules sont remises en suspension dans du milieu sans pronase de façon à obtenir une concentration de $1-2 \times 10^6$ cellules/ml (concentration vérifiée grâce à un haemocytomètre).

Une fraction aliquote de 500 µl de cette suspension cellulaire est incubée en présence de 50 µl de [³H]-thymidine (2 µCi/tube), et de 100 µl d'extrait, dans des tubes stériles de 10 ml. Dans les tubes témoins, les 100 µl d'extraits sont remplacés par 100 µl de milieu. L'incubation s'effectue durant 3h 30 dans le noir et sous agitation modérée.

Pour arrêter l'incubation, 3 ml d'acide perchlorique (0,6 N, 4°C) sont ajoutés dans chaque tube afin de faire éclater les cellules. Les tubes sont maintenus dans de la glace durant 1h afin de faire précipiter les macromolécules, puis centrifugés (4000 g, 10 mn). Les culots sont lavés deux fois dans de l'acide perchlorique (0,6 N), puis dissous dans 500 µl de potasse (0,3 N) à 60 °C durant une heure.

Les fractions aliquotes sont ensuite placées dans des tubes en polyéthylène contenant 5 ml de liquide scintillant (Pico Fluor T.M. 15). La radioactivité, comptée grâce à un compteur à scintillation, est exprimée en désintégrations par minutes (dpm).

b) **La mobilisation du glycogène** par les cellules à glycogène du bivalve est estimée par la méthode de Lenoir *et al.* (1989) et Robbins *et al.* (1990). Le principe de ce bioessai est, dans un premier temps, de préincuber les cellules à glycogène en présence de glucose marqué. Ce glucose est incorporé par les cellules et utilisé pour synthétiser du glycogène. Dans un second temps, ces suspensions de cellules contenant du glycogène marqué sont incubées en présence des extraits à tester. Nous pouvons alors comparer le contenu en glycogène marqué des cellules incubées en présence d'extrait et des cellules incubées sans extrait, et en déduire l'effet des extraits sur la mobilisation du glycogène. Cette technique présente non seulement les mêmes avantages que la technique précédente, mais la catégorie cellulaire concernée est ici purifiée.

Les cellules à glycogène sont obtenues par dissociation de palpes labiaux dans un milieu isosmotique, sans glucose, à base de Leibowitz L-15, et en présence de 0,1 % de pronase (Lenoir *et al.*, 1989). Elles sont purifiées grâce à une centrifugation sur gradient de densité (Percoll) suivi d'une centrifugation sur gradient de vélocité dans une solution d'albumine sérique bovine.

Le culot de cellules à glycogène purifiées est mis en suspension dans 1ml de milieu de culture contenant du [U-¹⁴C]-glucose (1 mM, 2 µCi) puis incubé durant 2h 30 dans le noir et sous agitation modérée.

Les cellules sont ensuite séparées du milieu de préincubation radioactif, par centrifugation à travers de l'huile de silicone (11000 g, 15 s). Les cellules marquées sont diluées dans du milieu de culture L-15 non radioactif de façon à obtenir une concentration de 0,5-1,0 x 10⁶ cellules/ml.

Des fractions de 100 µl de cette suspension sont incubées en présence de 50 µl de D-glucose (4 mM) et 50 µl d'extrait (remplacé par 50 µl de milieu dans les tubes témoins). L'incubation de 2h30 s'effectue dans le noir, à 15 °C et sous agitation modérée.

300 µl de potasse (30%) sont ensuite ajoutés dans chaque tube pour stopper l'incubation. Les tubes sont chauffés à 80 °C durant 10 mn, puis l'on ajoute 150 µl de sulfate de sodium (Na₂SO₄) saturé et 3 ml d'éthanol (95 %). Les tubes sont laissés toute la nuit à 4 °C, et les polysaccharides sont collectés par centrifugation (4000 g, 10 mn). Les culots sont lavés deux fois par resuspension dans 3 ml d'éthanol et recentrifugation. Ils sont ensuite séchés durant 24 h à 60 °C et dissous dans 500 µl d'eau bidistillée. Le contenu en ¹⁴C est estimé par comptage à scintillation grâce à un liquide scintillant (Instagel).

3) Préparation des extraits:

Les extraits testés dans ces deux bioessais proviennent de quatre sources: a) les ganglions cérébroïdes de l'hôte, b) l'hémolymphe de l'hôte, c) le tissu du parasite, d) et le tissu du manteau de l'hôte. Les extraits lyophilisés sont dissous dans le milieu de culture du bioessai et neutralisés à pH 7.

a) **Les ganglions cérébroïdes** d'animaux sains et infestés sont broyés dans de l'acide chlorhydrique (0,1 N) car les deux facteurs FAMG et HMG sont acidosolubles (Mathieu *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1990, *ss presse*). Les homogénats sont centrifugés (11000 g, 15 mn) puis les culots sont soumis à une ré-extraction dans les mêmes conditions. Les deux surnageants obtenus sont lyophilisés et conservés à -20 °C.

b) **L'hémolymphe** est collectée par ponction dans le muscle adducteur postérieur d'animaux entiers. Chaque animal est ensuite disséqué afin de savoir s'il est sain ou parasité. Les prélèvements effectués chez les animaux de même catégorie (sains ou parasités) sont additionnés. Les échantillons d'hémolymphe sont soit conservés à -20 °C afin d'être directement utilisés comme milieu de culture, soit lyophilisés et utilisés comme extraits.

c) **Les sporocystes ramifiés** de *P. squamatus* ne peuvent pas être isolés du tissu hôte. Les extraits de sporocystes sont donc réalisés à partir de fragments de manteau de moules particulièrement infestées, contenant très peu de tissu hôte. Bien que les **cercaires** ne soient pas directement en contact avec le tissu hôte, elles sont utilisées pour constituer des extraits de parasite pur. Elles sont collectées à l'aide de pipettes pasteur après rupture des sporocystes, puis lavées dans de l'eau bidistillée. Sporocystes

et cercaires subissent une extraction dans de l'acétate d'ammonium (10 mM pH 7,0)(Toullec *et al.*, 1988). Ce sel est sublimé lors de la lyophilisation.

d) Les extraits de sporocystes contenant du tissu hôte, il est nécessaire d'utiliser des **extraits de manteau** de moule comme témoins. Nous testons donc l'effet d'extraits de manteau de moules saines matures, de moules saines immatures et de moules parasitées sur les mitoses goniales. Le manteau de moules parasitées est prélevé uniquement dans des zones non colonisées par le trématode. Ces tissus sont extraits dans de l'acétate d'ammonium (10 mM).

4) La viabilité des cellules de manteau est estimée grâce au "trypan bleu dye exclusion test" (Phillips, 1973). Les suspensions cellulaires sont incubées durant 1 h en présence de bleu trypan (0,1 %). Les cellules mortes (seules colorées par le bleu trypan) et vivantes sont ensuite comptées sous microscope optique grâce à un oculaire réticulé.

5) Test statistique: l'effet des différents extraits sur les suspensions de cellules est systématiquement comparé à un témoin sans extrait grâce au test U de Wilcoxon-Mann-Withney (Scherrer, 1984). Ce test est également utilisé pour comparer deux à deux les effets de certains extraits.

RESULTATS

1) Effets sur les mitoses goniales:

*** Effet de l'infestation sur la sécrétion du facteur activateur des mitoses goniales par les ganglions cérébroïdes.**

L'incorporation de [³H]-thymidine par les cellules de manteau dissocié est significativement stimulée en présence d'extraits de ganglions de moules saines (Fig. 2). Une légère stimulation est exercée par les extraits de ganglions de moules parasitées, mais elle n'est ni significative par rapport au témoin sans extrait, ni différente de celle exercée par les extraits de ganglions de moules saines (test U: P>0,05)(Fig. 2). Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'effet du trématode sur la sécrétion du FAMG.

*** Comparaison des effets des extraits de manteau de moules et de parasite sur les mitoses goniales:**

Les extraits de manteau de moules saines non mûres, mûres, et de moules parasitées ont tous trois un effet inhibiteur significatif sur l'incorporation de [³H]-

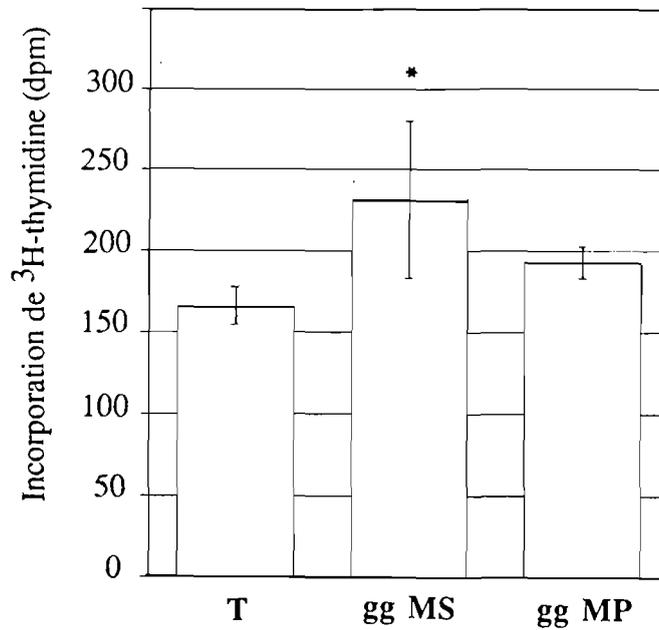


Figure 2: Effets d'extraits de ganglions cérébroïdes de moules saines (gg MS; dose équivalente = 2 ganglions) et de moules parasitées (gg MP; dose équivalente = 2 ganglions) sur l'incorporation de [³H]-thymidine au sein d'une suspension de cellules de manteau. Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s); n = 4.
* Significativement différent du témoin sans extrait (test U: P<0,05).

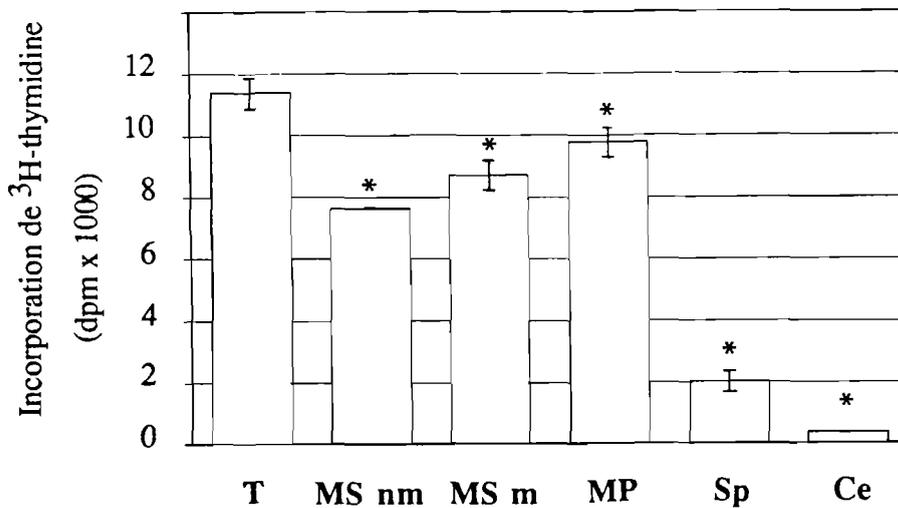


Figure 3: Comparaison des effets d'extraits de manteau de moules et de parasite sur l'incorporation de [³H]-thymidine au sein d'une suspension de cellules de manteau. T: témoin sans extrait (n=5); MS nm: moules saines non matures (n=4); MS m: moules saines matures (n=4); MP: moules parasitées (n=3); Sp: sporocystes (n=3); Ce: cercaires (n=4). La concentration des extraits dans le milieu d'incubation est de 3 mg/ml. Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s); n = 4.

Lorsque l'on compare les effets des extraits deux à deux, seule la différence entre MP et MS m n'est pas significative.

* Significativement différent du témoin sans extrait (test U: P<0,05).

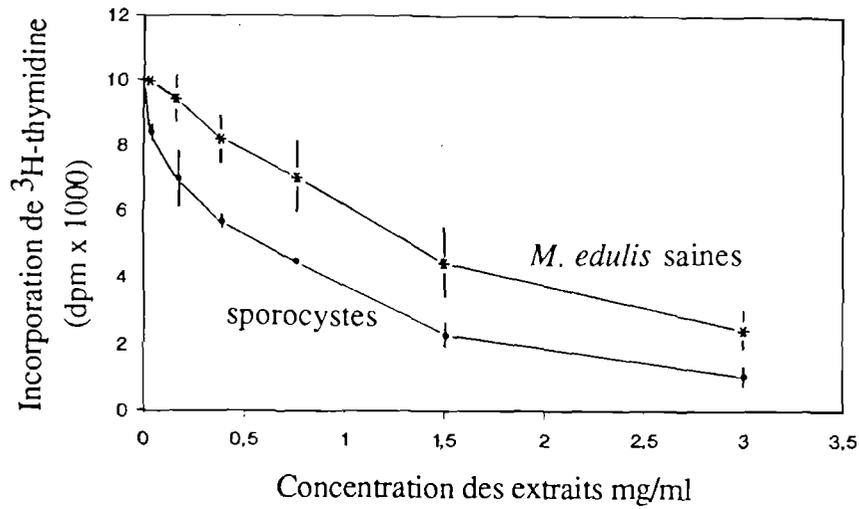


Figure 4: Effet-dose de l'action d'extraits de sporocystes et de manteaux de moules saines sur l'incorporation de [³H]-thymidine au sein d'une suspension de cellules de manteau. Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s); n=3.

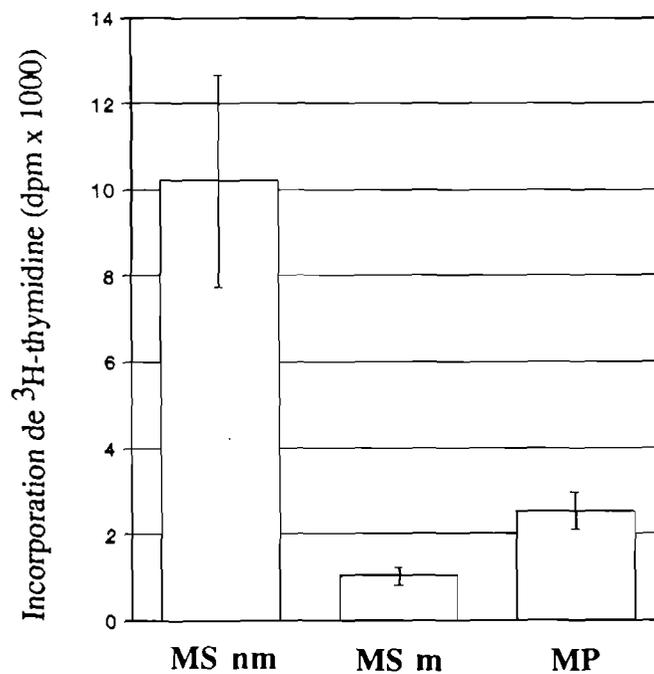


Figure 5: Incorporation de [³H]-thymidine au sein d'une suspension de cellules de manteau cultivées dans de l'hémolymphe de moules saines non matures (**MS nm**; n=4), de moules saines matures (**MS m**; n=5), et de moules parasitées (**MP**; n=5). Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s).

Lorsque les effets des extraits sont comparés deux à deux, toutes les différences sont significatives (test U: P>0,05).

thymidine (Fig. 3). Cependant, les extraits de sporocystes et de cercaires ont un effet inhibiteur beaucoup plus marqué sur ces cultures cellulaires (Fig.3). Notons que les extraits de cercaires, qui ne contiennent pas de tissu hôte, ont un effet inhibiteur encore plus marqué que celui des extraits de sporocystes.

L'effet inhibiteur des extraits de sporocystes et de manteaux augmente selon une courbe de type effet-dose (Fig.4).

*** Comparaison de l'activité mitotique de cellules cultivées dans de l'hémolymphe de moules saines mûres, saines immatures et de moules infestées:**

Les différences d'incorporation de [³H]-thymidine entre les suspensions cellulaires cultivées dans ces trois types d'hémolymphe (Fig 5) sont significatives lorsqu'elles sont comparées deux à deux (test U P<0,05). Cependant, l'incorporation de [³H]-thymidine est très nettement supérieure pour les cellules cultivées dans de l'hémolymphe de moules saines non mûres (Fig. 5).

*** Viabilité cellulaire:**

Les cellules de manteaux dissociés incubées durant 3h 30 en présence d'extraits de manteaux ou d'extraits de sporocystes présentent une viabilité statistiquement similaire (Tableau I). Elle est supérieure à 94 % dans les deux cas.

Tableau 1: Viabilité des cellules de manteau en suspension, après 3h30 d'incubation en présence d'extraits (3 mg/ml) de sporocystes (Sp) et de manteau de moules saines (MS). Résultats exprimés en cellules/0,1 mm³ (écart type s) (n=4), et en viabilité moyenne. La différence de viabilité cellulaire n'est pas significative (X² sur données brutes: X² = 4,82; ddl = 7; P>0,05).

Extraits	Cellules/0,1 mm ³		Viabilité %
	vivantes	mortes	
MS	408 (31)	20 (4)	95,3
Sp	418 (49)	18 (6)	94,9

2) Action sur la mobilisation du glycogène:

*** Effet de l'infestation sur la sécrétion de l'hormone mobilisatrice de glycogène:**

Les extraits de ganglions cérébroïdes de moules saines et parasitées ne stimulent pas significativement la mobilisation du glycogène par les cellules à glycogène (Fig 6).

*** Comparaison des effets des extraits de manteau de moules et de parasites:**

La mobilisation du glycogène par les cellules à glycogène n'est stimulée ni par les extraits de manteau de moules saines, ni par les extraits de manteau de moules parasitées (Fig. 7). Par contre, les extraits de sporocystes exercent une stimulation significative (Fig. 7).

*** Effet des extraits d'hémolymphe:**

Les extraits d'hémolymphe de moules saines et parasitées stimulent significativement la mobilisation du glycogène par les cellules à glycogène (Fig. 8). Les stimulations exercées par ces deux extraits ne sont pas statistiquement différentes.

* L'action de ces extraits sur la **viabilité cellulaire** n'a pu être testé par coloration au bleu trypan car la structure particulière de ces cellules (amas de glycogène bordé d'une fine couche de cytoplasme périphérique) les rend peu colorables. Toutefois, des travaux préliminaires ont montré que l'incorporation de glucose marqué est linéaire durant 6h quelque soit le type d'extrait utilisé, ce qui montre que les extraits ne diminuent pas la viabilité des cellules à glycogène durant cette période.

DISCUSSION

Les résultats de cette étude montrent que les extraits de sporocystes et cercaires inhibent très fortement l'incorporation de thymidine au sein des suspensions de cellules de manteau de moules.

Ce blocage de l'incorporation de thymidine n'est pas lié à une diminution de la viabilité des cellules en suspension. Nous en déduisons qu'il y a inhibition de la synthèse d'ADN et donc de l'activité mitotique. Nous pouvons conclure que le parasite contient un (ou plusieurs) facteur(s) responsable(s) de cette inhibition. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Pearson et Cheng (1985) sur le système *Illyanassa obsoleta* (gastéropode) / *Zoogonus lasius* (trématode). Ces auteurs observent une inhibition de l'incorporation de [³H]-thymidine dans certaines des spermatogonies, lorsque les testicules du mollusque sont incubés durant 96 h en présence d'extraits de trématode.

Dans ces deux systèmes, il est clair qu'une activité antimitotique est exercée par les extraits de parasite. Cependant, dans les deux cas, l'inhibition des mitoses goniales

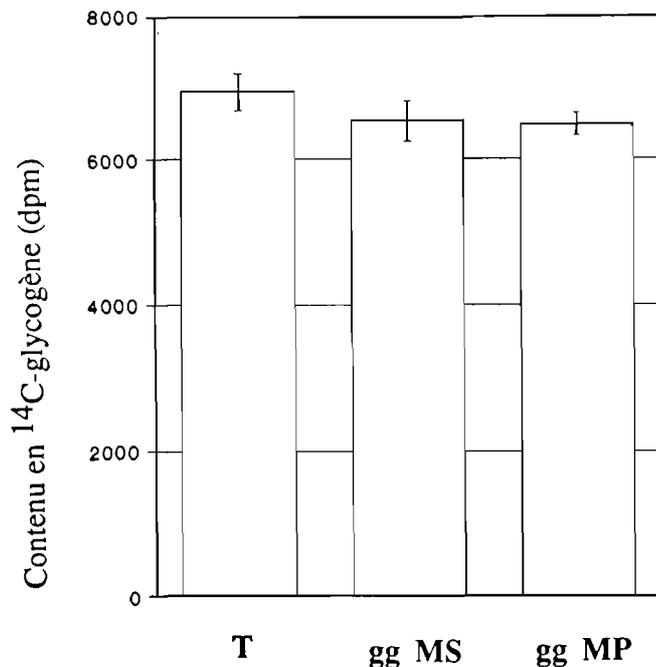


Figure 6: Effets d'extraits de ganglions cérébroïdes de moules saines (gg MS; dose équivalente = 20 ganglions) et de moules parasitées (gg MP; dose équivalente = 20 ganglions) sur le contenu en [U-14C]-glycogène de cellules à glycogène purifiées prémarquées. T: témoin sans extrait. Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s); n=4. Les effets des extraits ne sont pas significatifs (test U: $P > 0,05$).

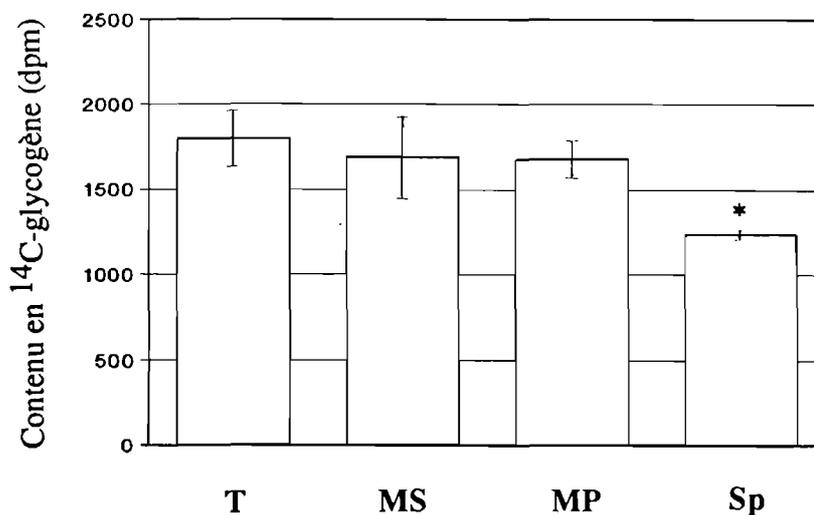


Figure 7: Effets des extraits de manteaux de moules saines (MS; n=4), de moules parasitées (MP; n=5), et de sporocystes (Sp; n=4) sur le contenu en [U-14C]-glycogène de cellules à glycogène purifiées prémarquées. La concentration des extraits est de 10 mg/ml dans le milieu d'incubation. Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s);

* Significativement différent du témoin sans extrait(T) (test U: $P < 0,05$).

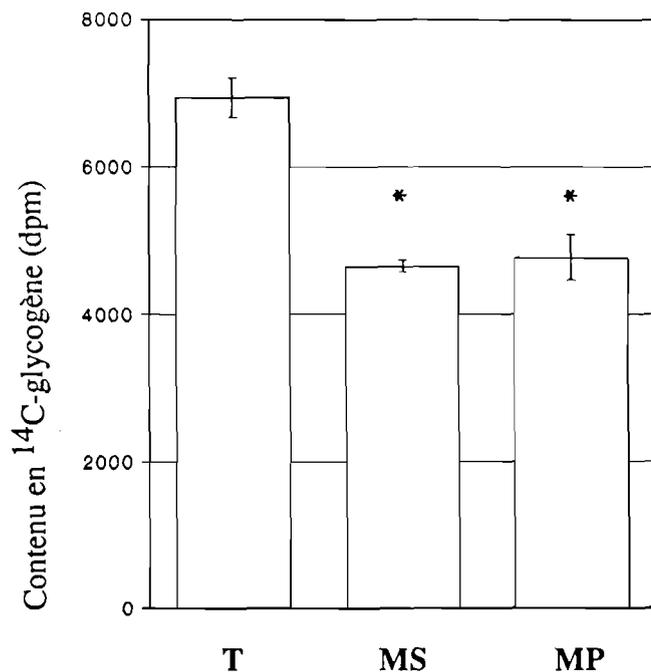


Figure 8: Effets des extraits d'hémolymphe de moules saines (MS; 1 ml équivalent) et parasitées (MP; 1 ml équivalent) sur le contenu en [U-¹⁴C]-glycogène de cellules à glycogène purifiées prémarquées. n=4. Résultats exprimés en dpm par million de cellules (s);

* Significativement différent du témoin sans extrait(T) (test U: P>0,05)

peut résulter soit d'une action directe sur les gonies, soit d'une action indirecte via un système inhibiteur endogène du mollusque.

En effet, nous montrons dans ce travail que les extraits de manteau de moules saines mûres et immatures exercent un effet inhibiteur sur les mitoses goniales. Ceci suggère qu'une substance inhibitrice des mitoses goniales est présente dans les tissus du manteau tout au long du cycle sexuel. Le fait que les suspensions de cellules de manteau incorporent beaucoup plus de [³H]-thymidine en présence d'hémolymphe de moules immatures qu'en présence d'hémolymphe de moules mûres suggère que ce facteur antimittotique est libéré dans l'hémolymphe lors de la maturité sexuelle.

Les résultats de Mathieu *et al.* (1988) appuient également l'hypothèse de l'existence d'un système de régulation des mitoses goniales. Ces auteurs ont montré qu'une diminution brutale d'activité de l'aspartate transcarbamylase se produit, lors de la maturité sexuelle, dans les cellules du manteau. La mesure de l'activité de cette enzyme permet également de mesurer l'activité mitotique lors de la gamétogenèse.

Le type cellulaire synthétisant cet antimittotique n'est pas encore identifié, mais il est forcément présent dans les suspensions de cellules du manteau que nous utilisons. De ce fait, il est possible que les extraits de parasites agissent sur ces cellules, et non pas sur les gonies. Il serait nécessaire de maîtriser la culture spécifique de cellules goniales pour déterminer si l'action parasitaire est directe ou indirecte.

Un exemple de trématode agissant par un relais endogène pour castrer l'hôte mollusque est donné par le système *Lymnea stagnalis/Trichobilharzia ocellata*. Le trématode *T. ocellata* semble induire la sécrétion, par le système nerveux central du mollusque, d'une neurohormone appelée schistosomin capable de bloquer l'effet des hormones gonadotropiques (De Jong-Brink *et al.*, 1988; Joosse *et al.*, 1988; Hordijk *et al.*, 1990).

Nous n'observons pas d'action de *P. squamatus* sur les sécrétions des facteurs hormonaux par le système nerveux central de *M. edulis*. Cependant, ces résultats sont obtenus à partir de sporocystes bien développés. Il n'est pas à exclure que les sécrétions endocrines de l'hôte puissent être perturbées au cours des premiers stades de l'infestation, période où débutent la gamétogenèse et la mobilisation du glycogène.

Une meilleure connaissance des mécanismes de régulation hormonale de la reproduction de *Mytilus* est nécessaire pour élucider le mode d'action de *P. squamatus*.

Parallèlement à l'action sur les mitoses goniales, il est démontré que *P. squamatus* contient un facteur capable de stimuler directement la mobilisation du glycogène par les cellules à glycogène. Par contre, les ganglions et l'hémolymphe des

individus parasités ne semblent pas stimuler la mobilisation du glycogène de façon plus marquée que les ganglions et l'hémolymphe des individus sains. Dans ce cas, l'effet activateur du trématode sur la mobilisation du glycogène pourrait être direct et localisé à la zone de contact bivalve-trématode, comme cela a déjà été suggéré pour un autre système mollusque/trématode (Cheng et Snyder, 1962).

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que la castration parasitaire de *M. edulis* est principalement induite par l'action antimitotique (directe ou indirecte) de *P. squamatus*. La perturbation du cycle de stockage/mobilisation du glycogène peut, à la fois, contribuer à la castration de l'hôte, et servir aux besoins nutritionnels du parasite.

Rappelons que chez un bivalve sain, les réserves nutritionnelles stockées dans le tissu de réserve, sont mobilisées au profit du système de reproduction.

Il est probable que le fait de bloquer la gaméto-genèse d'une part, et de stimuler la mobilisation des réserves d'autre part, permet à *P. squamatus* de bénéficier, pour son développement, du maximum d'apport nutritionnel compatible avec la survie de l'hôte.

**DEBUT DE CARACTERISATION DES PROPRIETES
BIOLOGIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES FACTEURS
INHIBITEURS DES MITOSES GONIALES.**

CHAPITRE V

DEBUT DE CARACTERISATION DES PROPRIETES BIOLOGIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES DES FACTEURS INHIBITEURS DES MITOSES.

INTRODUCTION

Les résultats exposés au chapitre précédent suggèrent d'une part, que certaines cellules du manteau de *M. edulis* sécrètent un facteur inhibiteur des mitoses goniales susceptible d'être libéré dans l'hémolymphe, et d'autre part, que les sporocystes de *P. squamatus* sécrètent un facteur responsable de l'inhibition directe ou indirecte des mitoses goniales du mollusque.

L'action inhibitrice des extraits de parasite peut donc s'exercer grâce à trois types de facteurs:

- facteur antimitotique identique à celui du mollusque
- facteur antimitotique différent de celui du mollusque
- substance provoquant la libération du facteur endogène (forcément différente de ce dernier).

Le rôle éventuel des systèmes de contrôle de la reproduction dans l'arrêt de la gamétogenèse n'a fait l'objet, à notre connaissance, d'aucune étude chez les bivalves. La compréhension du mode d'action précis du trématode nécessite donc d'étudier en parallèle le facteur inhibiteur des mitoses sécrété par l'hôte (que nous appèlerons **F.I.M.h**) et le facteur inhibiteur des mitoses sécrété par le trématode (que nous appèlerons **F.I.M.p**).

Afin d'aborder la caractérisation des molécules actives, nous analysons dans ce travail:

1) La spécificité de l'effet biologique des deux facteurs: pour cela, nous comparons leurs effets sur l'activité mitotique de cellules germinales d'autres mollusques bivalves ainsi que sur l'activité mitotique et la synthèse protéique de cellules somatiques de *M. edulis*.

2) **Leurs propriétés physico-chimiques:** thermostabilité, résistance à la trypsine, solubilité dans des solvants de différentes polarités, et enfin, masses moléculaires.

MATERIEL ET METHODES:

1) Animaux:

Les adultes de *M. edulis* destinés à la préparation des extraits sont immédiatement disséqués sous une loupe binoculaire. Les moules *M. edulis* et *M. galloprovincialis*, les huîtres *Ostrea edulis*, et les coquilles St Jacques *Pecten maximus*, destinées aux bioessais, sont maintenues 48 h dans de l'eau de mer filtrée, avant expérimentation. Des antibiotiques (penicilline 50000 UI/l, auréomycine 30 mg/l) sont ajoutés à l'eau de mer 24 h avant l'expérimentation. Seuls les individus sains sont conservés pour la réalisation des suspensions cellulaires.

2) Suspensions cellulaires:

L'effet des extraits sur l'activité mitotique de cellules germinales est testé sur des suspensions cellulaires de tissus de manteau de *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Il est également testé sur des suspensions cellulaires de gonades de *Ostrea edulis* et *Pecten maximus*. Ces tissus sont dissociés selon le protocole décrit pour le manteau de *M. edulis* (chap. IV).

Afin de tester l'effet des deux facteurs sur l'activité mitotique et la synthèse protéique de cellules somatiques, nous avons utilisé les cellules de bords de manteaux de *M. edulis*. Ces cellules somatiques, responsables de la croissance linéaire du bivalve, présentent des activités mitotiques et de synthèse protéique suffisamment importantes pour être mesurées grâce aux bioessais que nous utilisons (Toullec *et al.*, 1988). La dissociation des bords de manteau de *M. edulis* est réalisée en présence de pronase (0,1 %) et de collagénase (0,05 %), en raison des fortes jonctions intercellulaires (Toullec *et al.*, 1988).

3) Bioessais:

* **L'activité mitotique ou synthèse d'ADN** est estimée au sein des différentes suspensions cellulaires, grâce à la mesure du taux d'incorporation de [³H]-thymidine. Ce test est réalisé selon le protocole décrit au chapitre précédent.

* **La synthèse protéique** est estimée au sein des suspensions de cellules de bords de manteaux grâce à la mesure du taux d'incorporation de [¹⁴C]-Phénylalanine. Ces suspensions cellulaires sont en fait soumises à un double marquage puisque le milieu d'incubation contient de la [³H]-thymidine (2 µCi/ tube) et de la [¹⁴C]-Phénylalanine (2 µCi/tube). Ce double marquage permet de pouvoir comparer quantitativement l'effet des extraits sur la synthèse d'ADN, et sur la synthèse protéique, au sein des mêmes suspensions cellulaires.

4) Préparation des extraits:

a) **Extraits salins:** Les tissus de manteaux de moules saines, et de sporocystes sont soumis à une extraction en solution saline (acétate d'ammonium 10 mM, pH 7,4) selon le protocole décrit précédemment (Chap. IV).

b) **Autres extraits:** Afin de tester la solubilité des F.I.M.h et F.I.M.p, des extraits salins lyophilisés sont dissous dans de l'acide chlorhydrique (0,1 N), dans du méthanol, ou dans de l'acétonitrile (8 mg de lyophilisat pour 1ml de solvant). Les suspensions sont maintenues 5 mn sous agitation puis centrifugées (11000 g, 5mn). Les surnageants sont prélevés. L'acide chlorhydrique est neutralisé puis lyophilisé. Le méthanol et l'acétonitrile sont évaporés. L'effet de ces extraits est comparé à celui d'extraits salins non traités.

c) **Traitements par la chaleur:** Les extraits salins lyophilisés sont maintenus à 37 °C ou à 100 °C durant 30 mn dans un bain à sec, puis refroidis dans de la glace pilée.

d) **Traitement par une enzyme protéolytique:** 8 mg d'extraits salins lyophilisés sont dilués dans 1 ml d'acétate d'ammonium (10 mM), puis incubés en présence de trypsine (25 mg de trypsine insoluble fixée sur des bille de verre D.I.T.C.). L'incubation se fait à 37 °C (pour faciliter l'action de la trypsine) durant 30 mn sous agitation. Une fois l'incubation terminée, la trypsine est éliminée par centrifugation (500 g, 2 mn). Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation, mais en absence de trypsine.

e) **Filtration sur gel:** Le début de caractérisation des masses moléculaires des facteurs est réalisé par fractionnement des extraits (manteau de moule et sporocystes) sur colonne de filtration (Séphadex). 300 mg d'extraits salins lyophilisés sont dilués

dans 3 ml d'acétate d'ammonium (10 mM, pH 7,4) puis déposés sur une colonne Séphadex G 50 superfine (2,6 x 30 cm). L'élution s'effectue **par gravité** dans un tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 7,4). Une fois l'élution terminée, les fractions de 10 ml sont lyophilisées. Au moment de l'expérimentation, chaque lyophilisat est repris dans 200 µl de milieu de culture de façon à pouvoir tester deux fois (2 x 100 µl) l'action de chaque fraction sur les suspensions cellulaires.

L'étalonnage de la colonne est réalisé par passage de différentes substances dont on connaît le poids moléculaire: la myoglobine (17800 Da), le cytochrome C (12300 Da), "l'insuline B" (3495 Da), "l'insuline A" (2532 Da), et la bacitracine (1450 Da). Le volume mort (V_0) est déterminé par passage d'une solution de bleu dextran: $V_0=53$ ml; et le volume total (V_t) est mesuré par passage de DNP alanine: $V_t=269$ ml (Fig. 1).

Connaissant le volume d'élution de ces substances, on calcule leur K_{av} respectif (K_{av} = coefficient de partage d'une molécule entre les phases aqueuses intérieures et extérieures aux grains du gel). $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$. La droite de calibration (Fig. 1) est tracée par report de la valeur du coefficient de partage (K_{av}) de chacune des substances étalons, en fonction du logarithme de leur poids moléculaire respectif.

Cette droite de calibration permet ensuite de déterminer le poids moléculaire d'une substance, à partir de son volume d'élution.

* Avant expérimentation, les différents extraits lyophilisés sont repris dans du milieu de culture et neutralisés à pH 7.

RESULTATS:

1) Spécificité de l'effet biologique des F.I.M.h et F.I.M.p:

a) Action sur les gonies d'autres mollusques bivalves:

Les extraits salins de manteau de moules saines et de sporocystes ont tous deux un effet inhibiteur marqué sur l'incorporation de [3 H]-thymidine au sein de suspensions cellulaires de manteaux dissociés de *M. galloprovincialis* d'une part, et de gonades de *Pecten maximus* d'autre part (Fig. 1 b,c). Leur effet inhibiteur suit une courbe de type effet-dose comparable à celle obtenue avec les cellules de manteau de *M. edulis* (Fig. 1 a,b,c).

L'effet inhibiteur de ces deux types d'extraits est par contre différent sur les cellules de gonades d'*Ostrea edulis* (Fig. 1d). Les extraits de sporocystes ont un effet

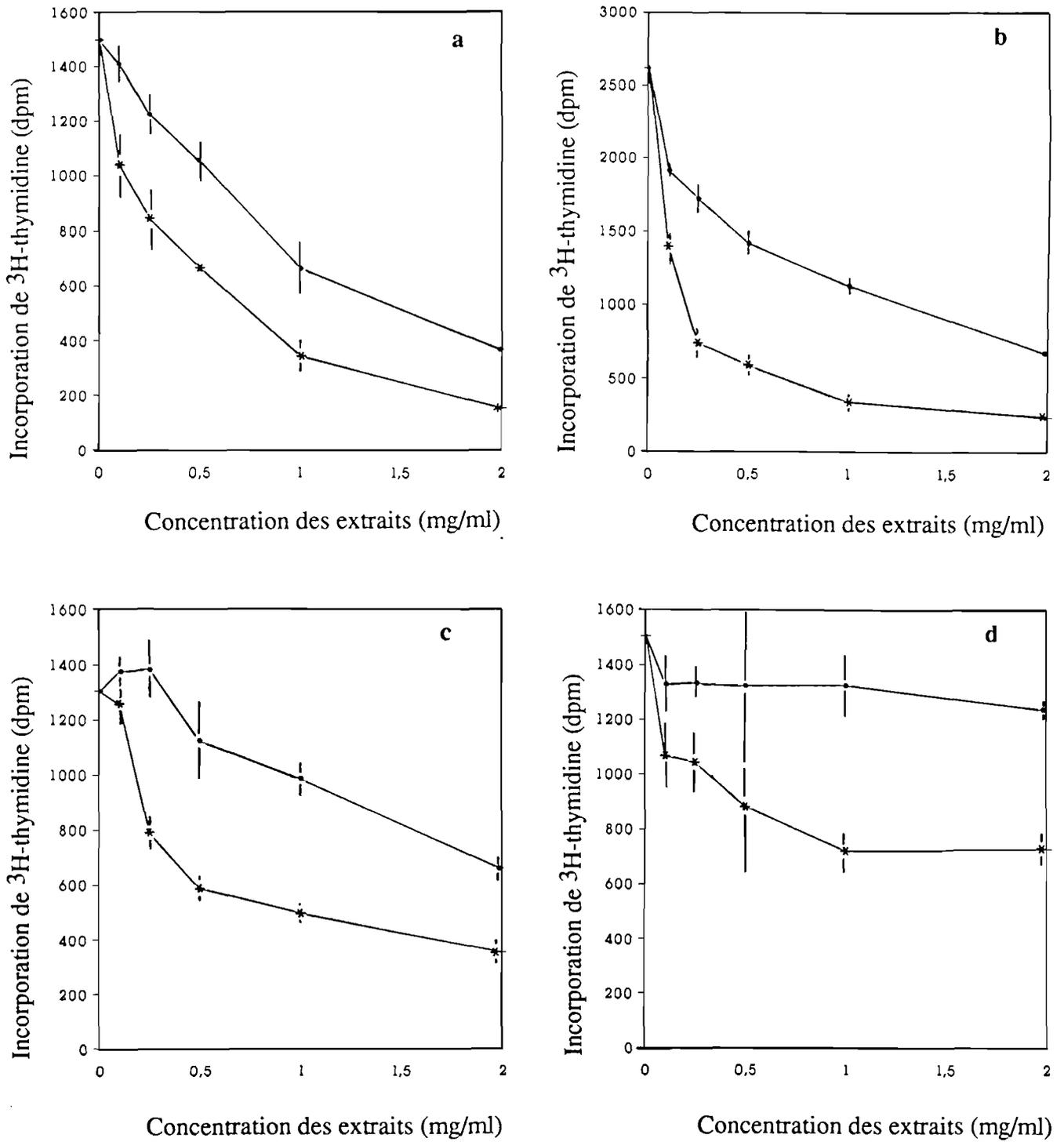


Figure 1: Action dose-dépendante d'extraits de manteaux de *M. edulis* saines (◻) et de sporocystes de *P. squamatus* (*) sur l'incorporation de [³H]-thymidine par des suspensions cellulaires provenant de quatre sources: a: cellules de manteaux dissociés de *M. edulis*. b: cellules de manteaux dissociés de *M. galloprovincialis*. c: cellules de gonades dissociées de *Pecten maximus*. d: cellules de gonades dissociées de *Ostrea edulis*. Résultats exprimés en dpm/million de cellules (s); n=4.

inhibiteur significatif sur l'incorporation de [³H]-thymidine, et cet effet est lié à la concentration de l'extrait. Par contre, les extraits de manteau n'ont pas d'effet significatif sur l'incorporation de [³H]-thymidine par les suspensions de gonades dissociées d'huître (Fig. 1d).

Nous remarquons qu'au sein de chaque suspension cellulaire, les extraits de sporocystes ont un effet inhibiteur plus fort que les extraits de manteaux, à concentration égale. L'effet des extraits sur les différentes suspensions cellulaires ne peut pas être comparé quantitativement puisqu'il ne s'agit pas des mêmes cellules.

b) Action sur les cellules somatiques de *M. edulis*; voies métaboliques affectées.

Les extraits salins de manteaux de *M. edulis* et de sporocystes ont un effet inhibiteur sur l'incorporation de [³H]-thymidine par les suspensions cellulaires de bords de manteaux (Fig. 2a). Cet effet inhibiteur suit une courbe de type effet-dose. Par contre l'incorporation de [¹⁴C]-phényl-alanine par ces mêmes suspensions cellulaires n'est pas affectée par les extraits de manteaux de moules saines et de sporocystes (Fig. 2b).

2) Approche des propriétés physicochimiques des F.I.M.h et F.I.M.p:

a) Traitements par la chaleur:

Le FIMp semble conserver totalement ses propriétés après un traitement de 30 mn à 100 °C (Fig.3). Le FIMh conduit à une inhibition d'environ 60 % de l'incorporation de [³H]-thymidine au sein de suspensions cellulaires de manteaux dissociés, et d'environ 40 % après un traitement de 30 mn à 100 °C. Son activité inhibitrice est conservée, mais il est partiellement dégradé par la chaleur dans ces conditions.

b) Traitement par la trypsine:

L'incubation de 30 mn à 37 °C en présence de trypsine n'affecte pas les propriétés inhibitrices des FIM endogène et parasitaire (Fig. 4).

c) Solubilités des FIM endogène et parasitaire:

Les FIM endogène et parasitaire sont tous deux acidosolubles (Fig. 5), ce qui suggère qu'il ne s'agit pas de protéines. Par contre, ils présentent des différences dans leurs propriétés de solubilité dans le méthanol et l'acétonitrile. Il semble que le FIMh soit partiellement soluble dans le méthanol et l'acétonitrile, alors que le FIMp est totalement soluble dans le méthanol et non soluble dans l'acétonitrile (Fig. 5). Ces deux facteurs pourraient donc présenter des différences de polarité.

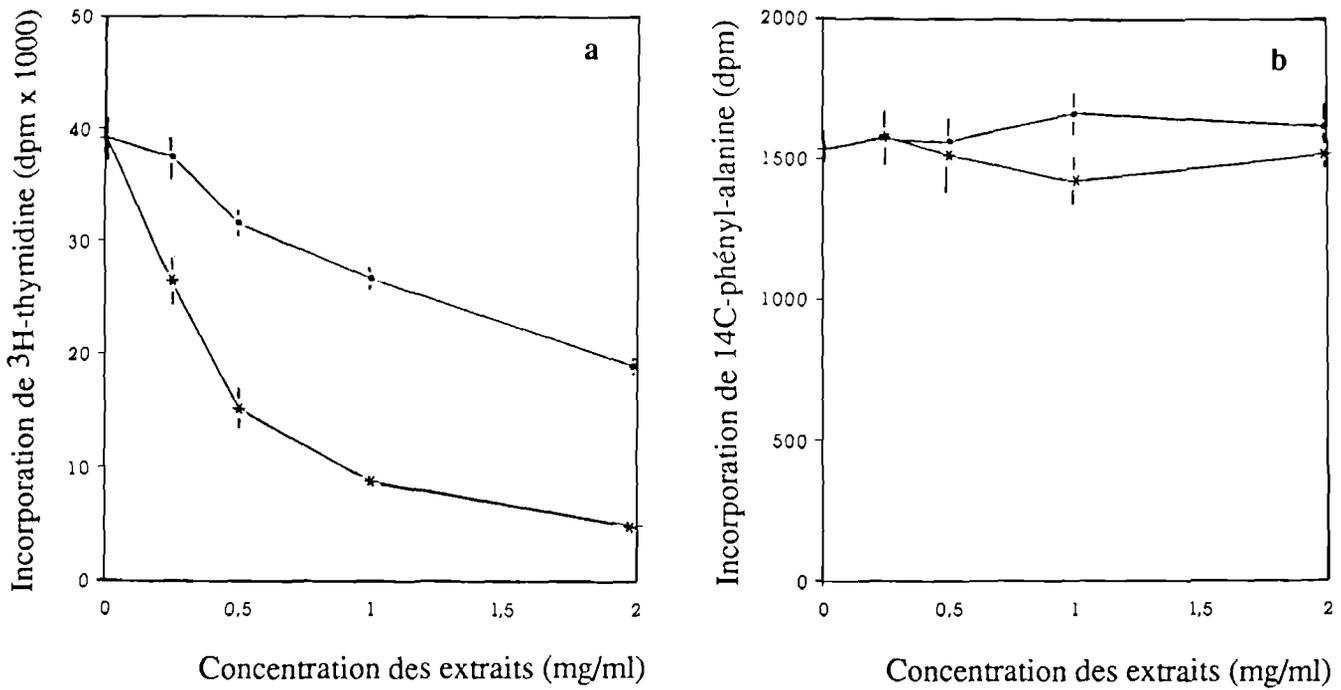


Figure 2: Action dose-dépendante d'extraits de manteaux de *M. edulis* saines (•) et de sporocystes (*) sur l'incorporation de [³H]-thymidine (a) et de [¹⁴C]-phényl-alanine (b) par des suspensions de cellules de manteaux. Résultats exprimés en dpm/million de cellules (s); n=3

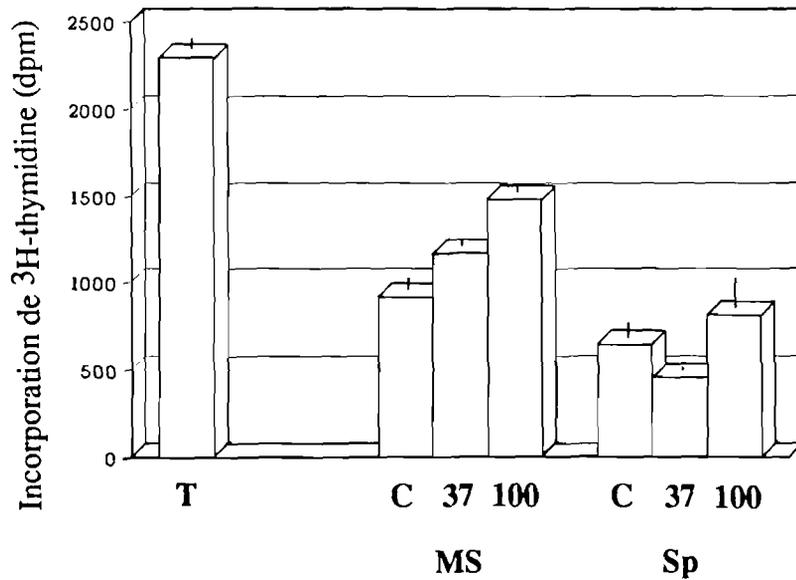


Figure 3: Action de la chaleur sur l'activité inhibitrice des extraits de manteaux de moules saines (MS) et de sporocystes (Sp): effet biologique des extraits sur l'incorporation de [³H]-thymidine par des suspensions de cellules de manteaux. T: témoin sans extrait; C: contrôles non traités; 37: extraits traités 30 mn à 37 °C; 100: extraits traités 30 mn à 100 °C. La concentration des extraits dans le milieu d'incubation est de 2 mg/ml. Résultats exprimés en dpm/million de cellules (s); n=3.

*: significativement différent du témoin (U test: P>0,05).

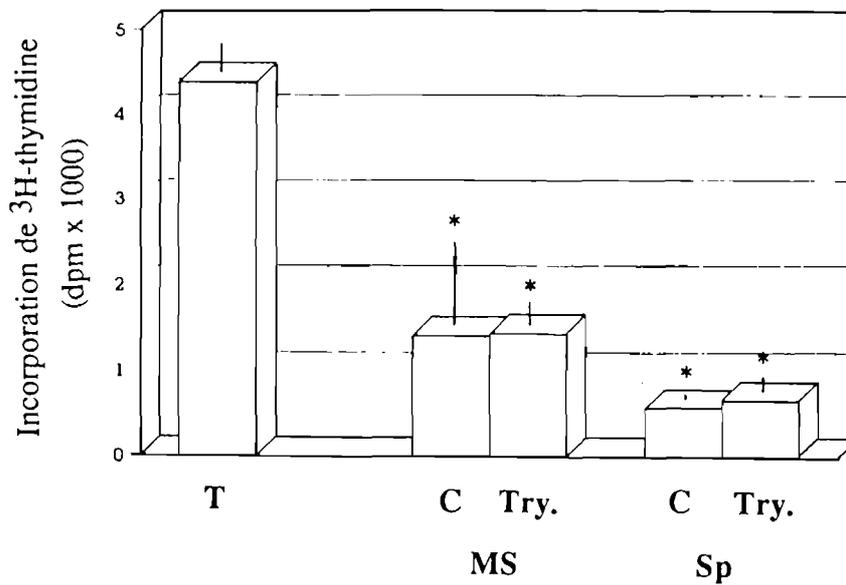


Figure 4: Action de la trypsine sur l'activité inhibitrice des extraits de manteaux de moules saines (MS) et de sporocystes (Sp): effet biologique des extraits sur l'incorporation de [³H]-thymidine par des suspensions de cellules de manteaux. T: témoin sans extrait; C: contrôles traités 30 mn à 37 °C; Try.: extraits incubés 30 mn à 37 °C en présence de trypsine. La concentration des extraits dans le milieu d'incubation est de 2 mg/ml. Résultats exprimés en dpm/million de cellules (s); n=4. *: significativement différent du témoin (U test: P>0,05).

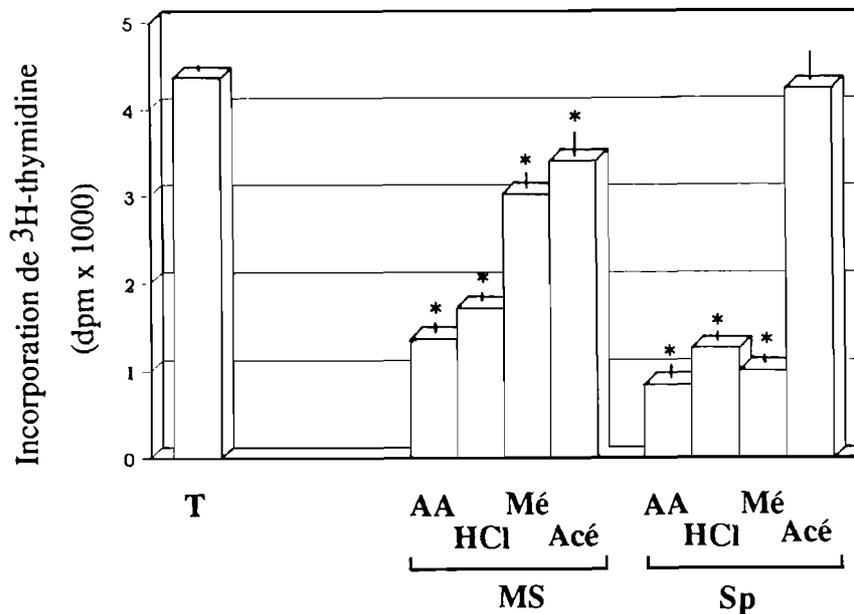


Figure 5: Solubilité des extraits de manteaux de moules saines (MS) et de sporocystes (Sp) dans l'acétate d'ammonium (AA), l'acide chlorhydrique (HCl), le méthanol (Mé), et l'acétonitrile (Acé): effet biologique des extraits sur l'incorporation de [³H]-thymidine par des suspensions de cellules de manteaux. T: témoin sans extrait. La concentration des extraits dans le milieu d'incubation est équivalente à 2 mg de lyophilisat (avant traitement) par ml. Résultats exprimés en dpm/million de cellules (s); n=4. *: significativement différent du témoin (U test: P>0,05).

3) Estimation des masses moléculaires des FIM:

Les résultats du test d'activité des fractions éluées sur colonne de filtration G 50 montrent des premiers pics d'inhibition situés aux environs du volume mort (Fig. 6a, 6b). De tels pics d'activité sont généralement artéfactuels, et expliqués par l'entraînement des molécules actives lors de l'élution des plus grosses molécules (protéines). Nous considérerons donc les seconds pics d'activité correspondant, pour le F.I.M.h et le F.I.M.p, à un volume d'élution compris entre 150 ml et 190 ml (Fig. 6a, 6b).

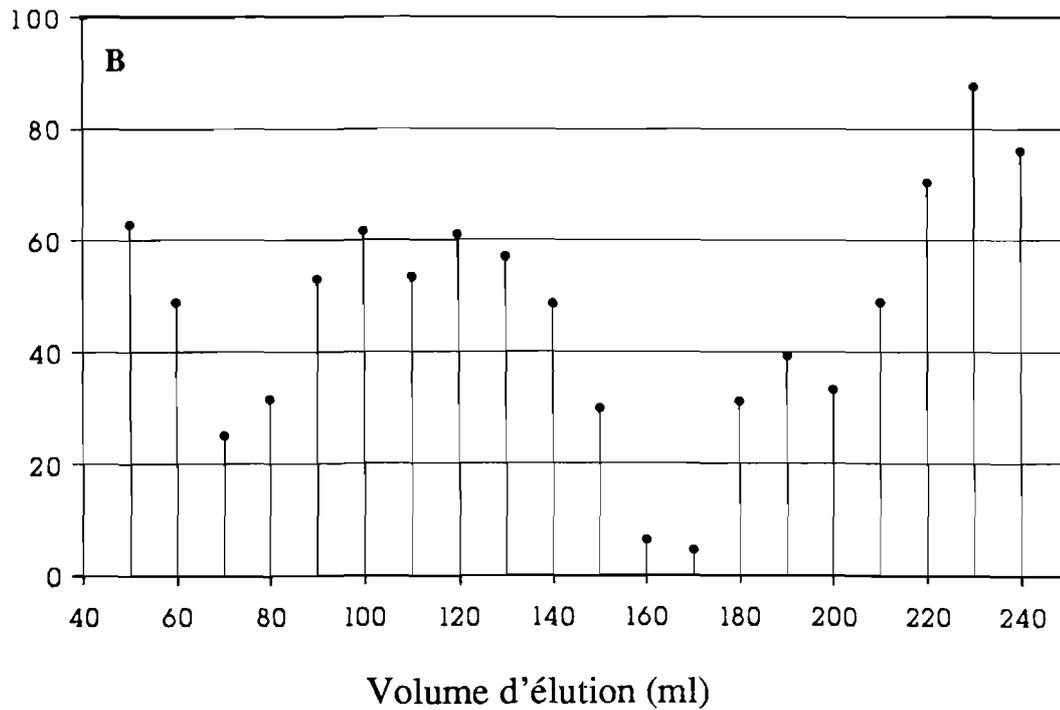
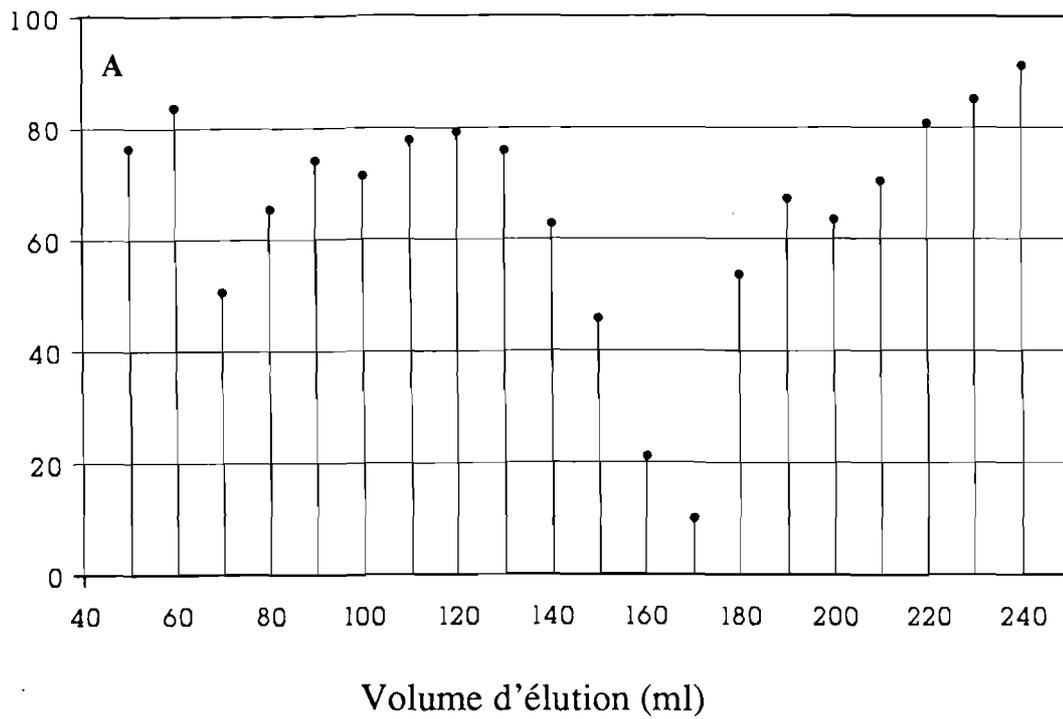
Ce large pic d'activité ne permet pas de déterminer leurs masses moléculaires avec précision. Nous pouvons cependant estimer que leur masse moléculaire apparente est comprise entre 2000 et 3500 Da (Fig. 6c).

DISCUSSION:

L'inhibition des mitoses goniales exercée par les extraits de manteaux de *M. edulis* et par les extraits de sporocystes de *P. squamatus* ne semble pas spécifique des gonies de *M. edulis*. En effet, ces extraits inhibent l'incorporation de [³H]-thymidine par les cellules de *M. galloprovincialis*, *Pecten maximus*, et, dans une moindre part, par les cellules d'*Ostrea edulis*. De plus ils inhibent l'incorporation de [³H]-thymidine par les cellules somatiques de bords de manteau de *M. edulis*. **Ces deux facteurs inhibiteurs des mitoses ne semblent donc ni spécifiques de l'espèce de bivalve, ni spécifiques de la catégorie cellulaire.**

Ils semblent par contre **très spécifiques** en ce qui concerne **les voies métaboliques** qu'ils affectent. L'inhibition de l'incorporation de [³H]-thymidine et la non inhibition de l'incorporation de [¹⁴C]-phénylalanine indiquent une action spécifique sur la synthèse d'ADN et non sur la synthèse protéique. Il ne s'agirait donc pas d'un blocage global du métabolisme cellulaire, mais d'un **blocage spécifique de la synthèse d'ADN.**

Ces observations sont réalisées sur des cellules somatiques et nous devons maintenant répéter ce double marquage sur les cellules du manteau. De plus, il est nécessaire d'utiliser des marqueurs radioactifs impliqués dans d'autres voies métaboliques pour déterminer précisément la (les) voie(s) métabolique(s) affectée(s).



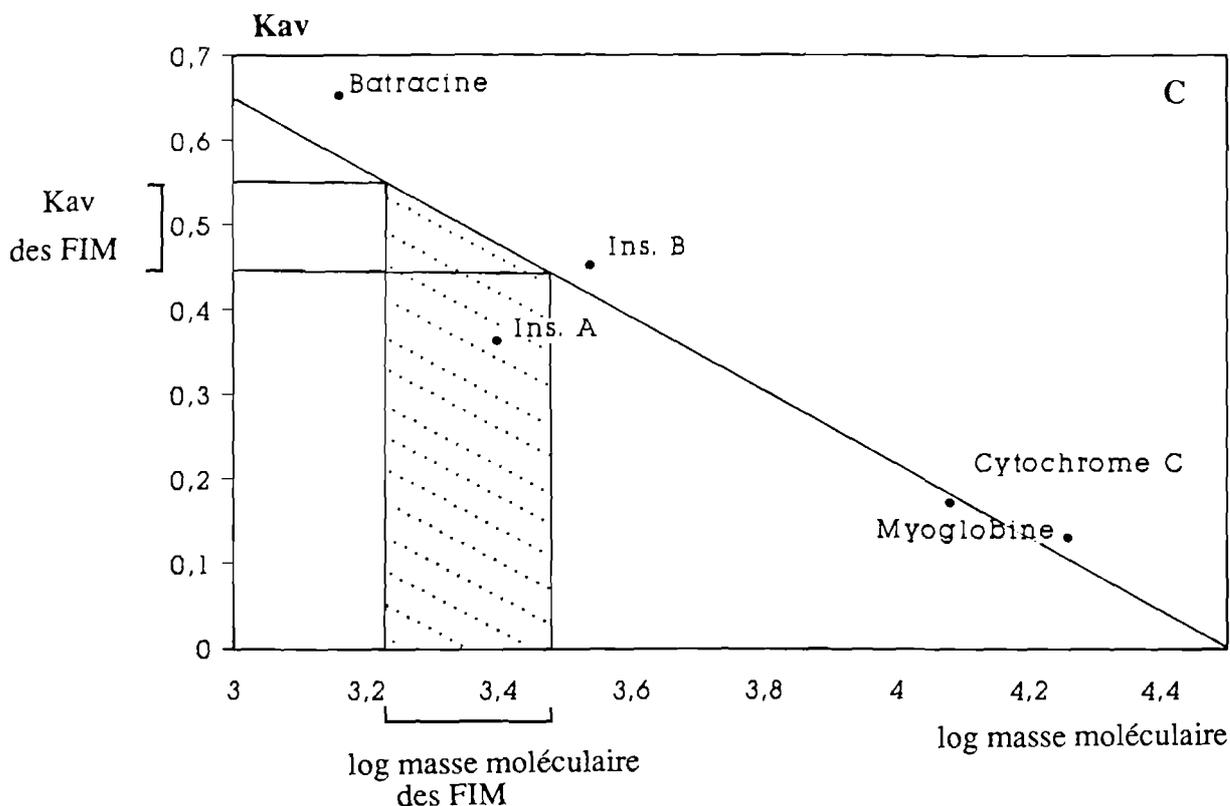


Figure 6: Fractionnement des extraits de manteaux de moules saines (A) et de sporocystes (B) sur gel Sephadex G50: effet biologique des éluats sur l'incorporation de [³H]-thymidine par des suspensions de cellules de manteaux. T: témoin sans extrait. Résultats exprimés en dpm/million de cellules; n=2. (C): Droite de calibration de la colonne de Sephadex G50. Détermination de la masse moléculaire apparente des F.I.M. endogène et parasitaire.

Les F.I.M.h et F.I.M.p présentent un poids moléculaire apparent situé aux environs de 2000 à 3500 Da. Ils sont tous deux acidosolubles, thermorésistants et non dégradés par la trypsine. Le fait de ne pas être dégradés par la trypsine ne permet pas de conclure qu'il ne s'agit pas de peptides. En effet la trypsine a un site d'action très spécifique, et un peptide peut très bien ne pas être dégradé par la trypsine. Nous devons donc tester l'effet d'autres enzymes protéolytiques.

D'autres étapes de caractérisation et purification sont nécessaires pour conclure sur la nature biochimique de ces facteurs, mais nos résultats peuvent déjà être rapprochés de ceux obtenus pour deux autres facteurs endocrines de *M. edulis*. Ainsi, le facteur activateur des mitoses goniales (FAMG) est acidosoluble, méthanol-soluble et présente une masse moléculaire inférieure à 5000 Da (Mathieu *et al.*, 1988). Ces propriétés biochimiques indiquent qu'il peut s'agir d'un peptide (Mathieu *et al.*, 1988). Le facteur de croissance présente une masse moléculaire comprise entre 1000 et 2000 Da (Toullec *et al.*, 1989) et n'est pas spécifique puisqu'il agit sur les cellules de *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philipinarum*, et *Pecten maximus* (Bivalves) (Toullec *et al.*, 1988).

Contrairement au FAMG et à l'hormone de croissance, le FIM de *M. edulis* ne semble pas être d'origine ganglionnaire, mais son action dose-dépendante, ainsi que sa circulation dans l'hémolymphe suggère qu'il peut être de nature hormonale.

Les résultats obtenus sur la spécificité d'action et sur les propriétés physico-chimiques des F.I.M.h et F.I.M.p suggèrent qu'il s'agit de deux facteurs différents. En effet, le F.I.M.h n'agit pas significativement sur les cellules dissociées de gonades d'huître, alors que le F.I.M.p présente une action dose-dépendante. De plus, ils ne présentent pas la même solubilité dans le méthanol.

Le fait que les extraits de sporocystes agissent sur les cellules somatiques ainsi que sur les cellules d'autres mollusques ne nous permet pas d'affirmer que le facteur responsable bloque la multiplication de façon directe. En effet, le test n'est pas réalisé sur des cellules purifiées et les suspensions cellulaires utilisées contiennent donc plusieurs types cellulaires.

L'hypothèse d'une action indirecte sur les mitoses goniales sous-entendrait d'une part, que chacun des mollusques utilisés possède un système de régulation (inhibition) des mitoses goniales, et d'autre part que le type cellulaire sécrétant le

facteur inhibiteur endogène soit présent dans les suspensions utilisées (ie dans le manteau de *M. galloprovincialis* et dans les gonades de l'huître et de la coquille St Jacques).

Les systèmes de contrôle endocrine de la reproduction sont encore très peu étudiés chez les mollusques bivalves et les seuls travaux réalisés dans ce domaine s'intéressent au FAMG de *M. edulis*. Nous ne possédons donc aucune information relative à la régulation (inhibition) de la reproduction chez *M. galloprovincialis*, *P. maximus* ou *O. edulis* permettant d'appuyer l'hypothèse d'action directe ou indirecte des extraits parasitaires.

Les mécanismes de contrôle de la reproduction sont mieux connus chez les gastéropodes que chez les bivalves (Lubet et Streiff, 1982), mais ils sont également plus complexes car ces mollusques possèdent des gonades différenciées et des tractus génitaux. L'analyse de la castration parasitaire au sein de différents systèmes gastéropode/mollusque conduit Le Breton (1979) à la conclusion suivante: "*Le parasitisme des trématodes digénétiques engendre de nombreuses anomalies de l'appareil génital que la simple destruction de la glande digestive ne peut expliquer. L'interprétation de l'action du parasite ne doit donc plus tenir compte uniquement du contrôle hormonal que la gonade peut exercer sur le tractus génital et qui disparaîtrait à la suite de la castration. Elle doit tenir compte aussi d'une activité chimique probable que les larves de trématodes peuvent exercer sur les organes génitaux ou bien sur le contrôle endocrine*".

Les approches biochimiques réalisées durant ces dernières années ont été effectuées en particulier sur le système *Trichobilharzia ocellata/Lymnaea stagnalis*. Comme nous l'avons déjà signalé, ces travaux ont permis de montrer que *T. ocellata* provoque la sécrétion par le système nerveux central du mollusque, d'une substance appelée "schistosomin".

La schistosomin circule dans l'hémolymphe du mollusque et bloque l'action des hormones gonadotropiques (Joosse et Van Elk, 1983; De Jong-Brink *et al.*, 1988; Hordijk *et al.*, 1989; De Jong-Brink et Bergamen-Sassen, 1989). Un travail récent a montré qu'une schistosomin circule également dans l'hémolymphe de *Biomphalaria glabrata* lorsqu'il est infesté par *Schistosoma mansoni* (De Jong-Brink *et al.*, 1990). Nous ne savons pas, à l'heure actuelle, si des substances dont l'effet serait comparable à celui des schistosomins, existent chez le mollusque sain. On peut en effet imaginer deux possibilités: soit l'infestation induit la sécrétion par le mollusque de nouvelles

substances; soit l'infestation stimule la sécrétion de substances que l'on ne perçoit pas normalement, lorsque le mollusque est sain.

Bien que de nombreux travaux soient encore nécessaires pour élucider le mode d'action de *P. squamatus*, nous pouvons d'ors et déjà conclure sur l'utilité d'une approche biochimique des relations mollusques-trématodes tant pour la compréhension des mécanismes de castration parasitaire, que pour la connaissance des systèmes de régulation du métabolisme hôte.

Sachant que:

1) La castration des mollusques par les trématodes est un phénomène très répandu,

2) les seules approches biochimiques sur le mode de castration suggèrent l'action de facteurs "antigonadotropes" (De Jong-Brink *et al.*, 1988) ou "antimitotiques" (Pearson et Cheng, 1985; nos propres travaux),

3) les travaux les plus avancés indiquent que ces facteurs sont sécrétés par le mollusque (De Jong-Brink *et al.*, 1990);

nous sommes tentés de poser les deux questions suivantes:

- N'existe-t-il pas d'une façon générale chez les mollusques des facteurs endocrines susceptibles de bloquer la reproduction (au niveau du développement des organes génitaux, des mitoses goniales, etc.) intervenant soit naturellement au cours du cycle sexuel, soit en condition de stress ?

- Si ces mécanismes existent, ne jouent-ils pas un grand rôle dans les phénomènes de castration lors d'infestations par les trématodes ?

CONCLUSION GENERALE

Au cours de notre travail, nous avons abordé les mécanismes qui régissent les associations hétérospécifiques par l'étude de plusieurs niveaux d'interaction entre le trématode *P. squamatus* et le complexe hôte *Mytilus* (premier hôte intermédiaire).

Rappelons brièvement les principaux résultats obtenus.

* Nous avons tout d'abord analysé la structure génétique des populations de *Mytilus* sur les côtes atlantiques françaises, afin de connaître l'ensemble des cibles potentielles du trématode.

L'analyse d'échantillons prélevés dans 9 localités a mis en évidence une forte diversité génétique inter et intra populationnelle, liée à la présence conjointe de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* sur ces côtes. Cette analyse a confirmé et caractérisé l'hybridation naturelle de ces deux formes, signalée auparavant sur la base de critères morphologiques (Seed 1973; Lewis et Seed 1969). L'interprétation des structures génétiques observées dans les différentes localités nous a conduit à émettre trois hypothèses principales que nous formulerons par des questions:

1. Le chevauchement des périodes de reproduction de *M. edulis* et *M. galloprovincialis* est-il variable en fonction des localités des côtes atlantiques françaises?

2. La distribution fine de ces deux formes est-elle liée à des pressions selectives environnementales différentielles? Ces pressions de sélection pourraient s'exercer en phase prérecrutée (sur les formes larvaires) ou postrecrutée (sur les individus fixés) et réduire la dispersion efficace de ces bivalves.

3. La structure génétique des populations naturelles est-elle stable dans le temps?

* Cette étude des relations entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* nous a permis d'aborder les interactions entre *P. squamatus* et *Mytilus*. Nous avons mis en évidence, lors d'une expérimentation en milieu naturel, les caractéristiques génétiques des individus atteints au sein des populations. Parmi un ensemble de génotypes représentatifs du complexe *M. edulis/M. galloprovincialis*, seuls les génotypes *M. edulis*, purs ou introgressés, sont infestés. Ainsi, les individus d'une même population géographique introgressée présentent un polymorphisme de compatibilité. Cette stricte spécificité de *P. squamatus* vis à vis de *M. edulis* a un déterminisme génétique. Elle

peut être source de pressions sélectives différentielles au sein des populations introgressées de la zone de sympatrie entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

* Enfin, à l'échelle individuelle, nous avons analysé les cibles atteintes par le parasite lors de son développement au sein de l'organisme hôte. Le mode d'action pathogène (castration) semble très sophistiqué. Cette approche physiologique des relations hôte-parasite suggère d'une part que *M. edulis* possède un facteur inhibiteur des mitoses (FIM) intervenant dans la régulation de ses mitoses goniales, et d'autre part, que sa castration par *P. squamatus* est induite par un facteur inhibiteur des mitoses. *P. squamatus* peut soit sécréter son propre F.I.M, soit stimuler la sécrétion du F.I.M. de l'hôte. *P. squamatus* semble également stimuler, par des voies biochimiques, la mobilisation du glycogène présent dans le tissu de réserve (principale ressource énergétique stockée par *M. edulis*).

Etant donné l'intérêt commercial de *Mytilus*, nous allons tout d'abord replacer notre travail dans le domaine de la biologie appliquée et présenter les perspectives qui en découlent. Ensuite, nous analyserons les relations mises en évidence entre *P. squamatus* et *Mytilus* dans le domaine de la biologie évolutive. Pour cela, nous confronterons nos résultats aux concepts de la spécialisation, et à ceux des interactions évolutives dans les systèmes hôte-parasite.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES EN BIOLOGIE APPLIQUEE

La France occupe actuellement la 3e place mondiale parmi les pays producteurs de moules. L'efficacité de l'activité mytilicole représente un enjeu économique important qui dépend de nos capacités, d'une part à gérer les stocks naturels, et d'autre part à augmenter la productivité des élevages. La gestion des stocks est un élément particulièrement déterminant en mytiliculture puisque tous les élevages sont réalisés à partir de captages de naissains en milieu naturel.

De nombreux efforts sont actuellement fournis pour améliorer les techniques d'élevage existant, et développer de nouvelles techniques telles que les filières flottantes en mer ouverte. Par contre, la structure et le fonctionnement des populations exploitées sont mal connus et font l'objet de peu de travaux.

* L'analyse de la structure génétique des populations de *Mytilus* sur le littoral français débute avec notre travail.



La grande diversité mise en évidence sur ces côtes peut être utilisée pour la mytiliculture. Actuellement, seule *M. edulis* est cultivée dans les régions de forte activité mytilicole. Ces sites sont saturés et d'autres élevages récemment mis en place utilisent maintenant des populations à caractères morphologiques intermédiaires dont on ne connaît pas le statut génétique. Il s'avère donc nécessaire de caractériser la structure génétique des populations naturelles et cultivées afin de connaître le potentiel génétique exploitable présent sur ces côtes. Les méthodologies de marquage moléculaire et de traitement des données que nous avons utilisées permettent de discriminer *M. edulis* de *M. galloprovincialis* et de mettre en évidence l'existence d'individus hybrides ou introgressés au sein des populations. Ces techniques devraient être utilisées pour caractériser la structure génétique des naissains captés dans les différentes régions du littoral français.

* La susceptibilité différentielle que nous avons mise en évidence au sein de populations de moules peut trouver une application directe en mytiliculture. En effet, certaines zones d'élevage de *M. edulis* telles que l'ouest-Cotentin sont particulièrement touchées par cette parasitose. L'élevage de naissains introgressés par *M. galloprovincialis* pourrait limiter le développement de *P. squamatus* dans ces biotopes. Cependant, la réussite de cette opération nécessite:

1. De connaître les sites de captage où le naissain présente les caractéristiques génétiques recherchées.
2. De connaître les "performances commerciales" de ces bivalves (survie, croissance, indice de condition, fécondité), en fonction de l'environnement et du mode d'élevage.

* Les résultats obtenus lors de notre approche biochimique ne sont pas directement applicables à la mytiliculture. Par contre, on conçoit aisément l'intérêt que peuvent présenter des facteurs inhibiteurs de mitoses en toxicologie ou pharmacologie. Un travail de purification et de caractérisation biochimique est toutefois nécessaire pour confirmer la nature antimétabolique de ces substances et déterminer leurs utilisations possibles.

* Notre travail, plus encore que d'apporter des réponses, a mis en évidence l'étendue des connaissances qu'il reste à acquérir. La caractérisation des stocks naturels et l'optimisation de leur gestion nécessite d'établir un programme multidisciplinaire dont les axes principaux seraient les suivants:



1) Poursuivre la caractérisation de la structure génétique des populations naturelles sur le littoral français;

2) Rechercher les sites où le captage naturel est important, analyser la variabilité de la structure génétique du naissain au cours des captages successifs (années successives), et apprécier la dispersion des larves dans les différents sites.

3) Analyser, dans chaque région d'élevage, les relations existant entre caractéristiques génétiques et:

- cycles de reproduction
- résistance aux facteurs abiotiques, taux de croissance linéaire et pondérale
- adéquation au type d'élevage utilisé (tenue en élevage)

4) Analyser les relations existant entre caractéristiques génétiques et résistance aux facteurs biotiques (essentiellement parasites). Notre travail nous permet de souligner l'importance de ce 4e axe de recherche, généralement peu développé en aquaculture.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES EN BIOLOGIE EVOLUTIVE

SPECIALISATION DE *P.SQUAMATUS* VIS A VIS DU COMPLEXE HOTE

Les endoparasites occupent un biotope vivant, c'est à dire susceptible de réagir et temporaire car mortel. Ils font donc partie des organismes présentant des modes de vie très spécialisés (Price 1980). Pourtant, au sein même des organismes parasites, il existe une grande diversité dans le degré de spécialisation des différentes espèces ou encore des stades parasites d'une seule espèce (Parlevliet, 1986). Pour illustrer ceci, comparons la spécialisation des stades métacercaires des trois trématodes *Fasciola hepatica* L., *Bucephalus polymorphus* Baer, 1827 et *Microphallus papillorobustus* (Rankin, 1940) Baer, 1943.

- Le premier stade larvaire de *F. hepatica* se développe chez une limnée. Les cercaires expulsées par la limnée et émises dans le milieu extérieur s'enkystent en métacercaires lorsqu'elles rencontrent un substrat végétal (végétaux aquatiques ou vivant en terrain inondable). L'hôte définitif s'infeste en ingérant ces végétaux. Chez ce parasite, le stade métacercaire peut donc se réaliser simplement au contact d'un substrat (Euzéby, 1984).

- Le premier hôte intermédiaire de *B. polymorphus* est une moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* Pallas, 1971. Les cercaires de bucephales émises par ce mollusque infestent plusieurs espèces de poissons téléostéens appartenant aux familles des *Cyprinidae*, *Esocidae* ou *Centrarchidae*. Elles s'enkystent dans le tissu musculaire de ces poissons (Wallet, 1984).

- Enfin, les cercaires de *M. papillorobustus*, qui sont émises par un mollusque du genre *Hidrobia*, infestent deux espèces jumelles de *Gammarus* et vont s'enkyster dans les ganglions cérébroïdes de l'amphipode. Cette localisation précise induit des modifications dans le comportement de l'hôte: en présence d'une menace telle que l'arrivée d'un prédateur dans le milieu, celui-ci s'agite à la surface de l'eau au lieu de s'immobiliser sur le substrat. Cette réaction anormale favorise la prédation du gammare par les goélands hôtes définitifs (Helluy, 1983).

Nous observons, à travers ces trois exemples, un degré croissant de spécialisation.

La spécificité parasitaire n'est qu'un aspect de la spécialisation. Ainsi, les adultes des nématodes *Subuluridae* se rencontrent chez diverses espèces d'oiseaux et de mammifères dont la particularité est de posséder un coecum digestif développé (Euzet et Combes, 1980). Ils sont donc spécialisés dans l'exploitation d'un organe, sans être spécifiques d'une espèce hôte. Dans ce cas, Euzet et Combes (1980) utilisent le terme de "spécificité pour un organe".

Nous proposons d'utiliser le concept général de spécialisation car il peut intégrer tous les paramètres relatifs à la réalisation du cycle évolutif des parasites.

* Le degré de spécialisation peut refléter les "impératifs de transmission" du parasite ou du stade parasitaire en question. Les métacercaires de *M. papillorobustus* en sont un exemple. Le comportement des métacercaires au sein de l'organisme gammare, favorise leur transmission à l'hôte définitif. Dans ce cas, la spécialisation du mode d'action parasitaire conduit à ce que l'on nomme en parasitologie la "favorisation" (Combes 1980).

* Le degré de spécialisation peut également être lié aux "impératifs de développement".

Si l'on compare les stades sporocystes et métacercaires des trématodes, il est clair que le besoin métabolique lié au développement d'une métacercaire enkystée sur un substrat ou dans le tissu musculaire de l'hôte est bien moindre que celui d'un stade sporocyste. Chez l'hôte mollusque, le miracidium de *P. squamatus* se métamorphose en

sporocystes branchus qui envahissent tous le corps de l'animal et produisent des milliers (ou millions?) de cercaires. Or, le stade sporocyste de *P. squamatus* est très spécifique alors que le stade métacercaire l'est peu (Matthews, 1972).

Ces différences de développement et de besoins métaboliques ont déjà été invoquées pour expliquer les différences de spécificité (Dubinina, 1964), mais le raisonnement peut se poursuivre au niveau de la spécialisation au sein de l'organisme.

Ainsi, la double approche que nous avons réalisé a montré une forte spécialisation de *P. squamatus* vis à vis des génotypes du complexe hôte d'une part, et une spécialisation au niveau de l'exploitation de l'organisme hôte d'autre part. L'induction biochimique de la castration de *Mytilus* et de la mobilisation des substances de réserves peut être interprétée comme une spécialisation métabolique permettant l'optimisation de la production cercarienne (multiplication asexuée du parasite). Le degré de spécialisation d'un stade parasitaire pourrait donc être lié aux besoins métaboliques de ce stade.

Cette hypothèse mérite d'être testée par l'étude des relations existant entre spécialisation (aux différents niveaux d'interaction hôte-parasite) et "production parasitaire" (indice quantitatif d'oeufs ou larves produits). Bien entendu cette comparaison ne peut s'effectuer qu'entre parasites et stades parasitaires équivalents. Nous pourrions notamment réaliser cette comparaison entre *P. squamatus* et les deux trématodes *Proctoeces maculatus* (Loos, 1901) Odhner, 1968, et *Rudolphinus crucibulum* (Rudolphi, 1819) Stunkard, 1974, que nous avons pu rencontrer chez *M. edulis* et *M. galloprovincialis*.

* La notion de spécialisation peut également intégrer les paramètres de l'écologie parasitaire.

La spécialisation d'un parasite vis à vis d'une espèce hôte ou au sein des organismes hôtes ne conduit-elle pas à une diminution de la compétition entre parasites par une augmentation de leur compétitivité dans un biotope donné (Holmes, 1973)?

* Enfin, si l'âge d'un système hôte-parasite (à l'échelle de l'évolution) a des conséquences sur le degré de spécificité parasitaire (Manter, 1966), ces conséquences doivent également se retrouver au niveau du degré de spécialisation du parasite.

La spécificité stricte de *P. squamatus* et son apparente capacité à contrôler le métabolisme hôte suggèrent une longue histoire évolutive du système *P. squamatus* / *M. edulis*.

P. squamatus aurait donc évolué uniquement au contact de *M. edulis* dans les zones géographiques du nord, et serait incapable d'utiliser la nouvelle ressource que constitue *M. galloprovincialis* qui est pourtant très proche génétiquement de *M. edulis*.

INTERACTIONS HOTE-PARASITE ET PROCESSUS EVOLUTIFS

Les différents processus évolutifs des systèmes hôte-parasite peuvent être analysés en fonction des différents modes d'interactions entre hôtes et parasites. Ainsi, la formalisation de ces interactions par un modèle simple basé sur la théorie des jeux (Maynard Smith, 1974, 1986) et sur les coûts sélectifs dans les populations, a permis à Renaud et de Meeus (ss presse) de montrer qu'il existe dans les systèmes hôte-parasite deux stratégies évolutivement stables (ESS- définie comme un phénotype tel que, si la plupart des individus présentent ce phénotype, aucun autre phénotype ne peut envahir la population - Maynard Smith et Price 1973). Ces deux "possibilités évolutives" correspondent à deux types d'interactions opposées.

Le premier type de confrontation ("Assassin") est caractérisé par des pressions sélectives réciproques maximales. Les populations parasites sont source de fortes pressions sélectives (virulence) sur les populations hôtes. Les mécanismes de résistance qui se développent chez l'hôte exercent, en retour, de fortes pressions de sélection sur les populations de parasites. Ce type d'interactions conduit aux processus de coévolution hôte-parasite (Anderson et May, 1982; Holmes 1983; May et Anderson, 1983; Barrett, 1986; Parlevliet, 1986; Thompson, 1986).

Dans le second type de confrontation, les pressions sélectives sont diminuées. Les populations de parasites minimisent leur impact sur les populations hôtes, et les hôtes "acceptent" les parasites en ne développant pas systématiquement de mécanismes de résistance.

La première est appelée "stratégie Assassin", elle correspond au "mutual aggression model" de Holmes (1983). La seconde est nommée "stratégie Diplomate", et correspond au "prudent parasite model" de Holmes (1983).

Les deux autres types d'interactions où seulement l'un des deux partenaires exerce de fortes pressions sélectives sur l'autre conduisent systématiquement à l'élimination du partenaire "diplomate", et à l'arrêt de la relation hôte-parasite.

Comment caractériser, sur les bases de ce modèle, les interactions évolutives du système *P. squamatus*/*Mytilus*?

L'observation d'une castration totale et de mortalités induites par le trématode suggèrent qu'il s'agit d'un système "assassin". En effet, dans ce cas les individus infestés ne produisent plus de descendants; le coût du parasitisme est maximum. Toutefois, si les sporocystes se lysent (Maillard com. pers.) une fois l'émission cercarienne réalisée, l'hôte reprendra, sauf nouvelle infestation, une activité reproductrice normale. Le parasite provoquerait alors une diminution temporaire de la fécondité de l'hôte et exercerait une pression sélective plus faible.

Il est donc nécessaire, pour pouvoir caractériser le mode d'interaction du système *Mytilus*/*P. squamatus*, de connaître la durée de vie de ce trématode au sein du mollusque, et de savoir s'il provoque directement la mort de l'hôte.

Envisageons maintenant les deux possibilités:

1- Si *P. squamatus* ne provoque pas systématiquement la mort de l'hôte et s'il n'affecte qu'une de ces périodes de reproduction, il s'agit d'un mode d'interaction "diplomate". L'étude fine des interactions évolutives dans le système hôte-parasite devra alors tenir compte **des pressions de sélection réciproques entre populations hôtes et parasites.**

Malgré son action pathogène marquée, *P. squamatus* peut n'exercer qu'une faible pression sélective sur les populations hôtes. On peut effectivement imaginer que la grande fécondité des individus sains compense les pertes dues au parasitisme (Combes 1990). Il est donc nécessaire de mesurer l'impact global de la castration sur les populations et de chiffrer les mortalités dues à ce parasite.

Il est également important de savoir s'il existe, au sein des populations de *M. edulis*, un polymorphisme de compatibilité à déterminisme génétique. En effet, s'il n'existe pas de polymorphisme de compatibilité à déterminisme génétique, tous les génotypes seront affectés de la même façon et le parasite peut diminuer la croissance démographique de la population concernée sans en modifier la structure génétique. La pression exercée par le parasite n'induit pas de processus évolutifs chez l'hôte.

De nombreux travaux sont donc nécessaires pour s'assurer de l'impact que peut exercer *P. squamatus* sur l'évolution des populations de *M. edulis*.

2- Si *P. squamatus* castré définitivement ou tue le mollusque, il est assimilable à un parasitoïde; ceci correspond, dans le modèle, à une "stratégie assassin". Or, comme nous l'avons vu, un tel parasite ne peut se maintenir que chez un hôte présentant la

même stratégie. Il est donc nécessaire de rechercher d'éventuels mécanismes de résistance à *P. squamatus* pour confirmer ceci.

Notons qu'une trop forte agression parasitaire peut conduire à une diminution de la virulence. Si les mortalités des moules s'effectuent avant l'émission cercarienne, elles entraînent automatiquement la mort du parasite. Le coût de la virulence devient trop élevé et entraîne la sélection des parasites les moins pathogènes (du moins ceux qui n'induisent pas la mort précoce de l'hôte). Ce type d'interactions tend à minimiser les pressions sélectives réciproques; l'un des exemples les plus connus est celui du virus de la myxomatose dans les populations de lapins en Europe et en Australie (Fenner et Ratcliffe, 1966; May et Anderson, 1983). Un tel processus sous entend que le système que nous observons est récent (cette hypothèse est examinée plus loin).

* Quelque soit l'état de ce système, nous pouvons d'ores et déjà envisager les processus évolutifs au sein des populations introgressées que nous observons actuellement sur les côtes atlantiques françaises. Le polymorphisme de compatibilité y est très marqué et *P. squamatus* ne peut que contre-sélectionner *M. edulis*. Il s'agit dans ce cas d'un impact sur la structure génétique des populations locales de la zone de sympatrie. Il est probable qu'au sein de cette zone, le parasite influence la compétition entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* et modifie les structures d'équilibre.

* Les relations évolutives d'un système hôte-parasite peuvent conduire, rappelons-le, à deux types d'interactions: l'un basé sur l'agression mutuelle, l'autre sur la minimisation mutuelle de l'agression (Renaud et de Meeüs, *ss presse*). Mais ces deux modes d'interaction correspondent à un état d'équilibre. Nous devons donc savoir si les interactions que nous observons sont en équilibre pour pouvoir caractériser un système hôte-parasite dans le cadre du modèle "assassin-diplomate".

En ce qui concerne le système *P.squamatus/Mytilus*, les interactions peuvent ne pas avoir atteint l'état d'équilibre, pour les trois raisons suivantes:

1- L'équilibre n'est pas atteint car le système est "jeune" (Combes, 1990). Bien que l'on ne puisse connaître "l'âge" du système *P. squamatus / M. edulis*, l'hypothèse d'un système récent semble peu probable. En effet, comme nous l'avons déjà noté, la spécialisation de *P. squamatus* au sein du compartiment mollusque appuie l'hypothèse d'une longue histoire évolutive. Toutefois à l'échelle de la microévolution, les relations entre les populations de *Mytilus* et de *P. squamatus* des côtes françaises peuvent être

récentes. Sachant que *P. squamatus* est considéré comme une espèce arctique (Chubrik, 1952; Brinkman, 1957) et que les côtes françaises semblent constituer la limite sud de sa distribution, nous pouvons imaginer que le contact entre les populations d'hôtes et de parasites des côtes françaises est récent. La grande fécondité et les temps courts de génération des helminthes doivent permettre une différenciation génétique rapide (Price, 1980) et une meilleure adaptation aux populations d'hôtes locales (phénomène de co-accommodation de Holmes 1983). Un contact récent pourrait expliquer une "mauvaise adaptation" du trématode qui entraîne des mortalités anormales au sein des populations hôtes.

2- L'équilibre n'est pas atteint car le système tel que nous l'observons est perturbé.

L'activité mytilicole peut provoquer plusieurs perturbations:

- Dans les régions où les moules élevées sont captées localement, l'introduction artificielle de substrats tels que les bouchots ou les filières modifient les paramètres du biotope et la taille des populations locales. La compétition pour l'espace et la régulation des populations sont totalement perturbés.

- Dans les régions où du naissain de type *M. edulis* est importé, l'introduction régulière de *M. edulis* peut annuler l'effet d'une sélection due au parasitisme, et permettre à *P. squamatus* de se maintenir à un taux élevé dans les populations hôte.

Les deux possibilités que nous venons de citer (système récent et perturbé) montrent la nécessité d'étudier les interactions au sein des populations du nord de l'Europe, dans des zones géographiques non perturbées par l'activité humaine.

3- L'équilibre tel que nous le concevons ne peut pas être atteint.

Etant donné que: i) la taille d'une population de *P. squamatus* dépend non seulement des interactions avec les populations de *Mytilus*, mais aussi des interactions avec les populations des hôtes intermédiaires (2e HI) et définitifs; ii) les populations de ces trois types d'hôte peuvent subir des fluctuations génétiques et démographiques dans l'espace et dans le temps; alors, les interactions que nous observons dans un même système peuvent varier dans l'espace et dans le temps, et s'inscrire dans un continuum entre le mode "Assassin" et "Diplomate". Ce type d'analyse doit donc intégrer le concept de métapopulation.

En conclusion, l'étude des mécanismes qui régissent les systèmes hôte-parasite offrent un champ d'investigation considérables et il faut bien plus de trois années de recherche pour comprendre les relations existant aux différents niveaux d'interaction d'un seul système.

La grande spécialisation de *P. squamatus* que nous avons mis en évidence vis à vis des génotypes hôtes (Coustau *et al.*, *ss presse a*) et au sein de l'organisme hôte (Coustau *et al.*, *ss presse b*), font de ce système un modèle privilégié pour l'étude des processus évolutifs à l'échelle de la micro évolution. L'étude des interactions génétiques doit se poursuivre au niveau de populations situées dans d'autres régions, et doit maintenant intégrer les paramètres de la variabilité génétique du parasite.

La mise au point de techniques d'infestation expérimentales permettrait de mieux caractériser les modalités du contrôle du métabolisme hôte par le parasite, et d'analyser les mécanismes de défense interne du mollusque. Les résultats issus de ces travaux devront être analysés en fonction des structures génomiques hôtes et parasites, afin de comprendre le déterminisme génétique et physiologique de la compatibilité hôte-parasite.

Seule la caractérisation simultanée des différents niveaux d'interaction peut nous permettre d'appréhender l'ensemble des mécanismes qui régissent ces associations hétérospécifiques et leur évolution.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

- ALVAREZ, G., ZAPATA, C., AMARO, R. et GUERRA, A. 1989.- Multilocus heterozygosity at protein loci and fitness in the european oyster, *Ostrea edulis* L. *Heredity*, **63** : 359-372.
- ANDERSON, R.M. et MAY, R.M. 1982.- Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, **85**: 411-426.
- BARRETT, J.A. 1983.- Plant-fungus symbioses. In : "*Coevolution*". D.J. Futuyma et M. Slatkin eds., Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts: 137-160.
- BARRETT, J.A. 1986.- Host-parasite interactions and systematics. In : "*Coevolution and Systematics*". A.R. Stone and D.L. Hawksworth eds., Clarendon Press, Oxford, Special volume, **32** : 1-17.
- BARSOTTI, G. et MELUZZI, C. 1968.- Osservazioni su *Mytilus edulis* L., e *M. galloprovincialis* Lamark. *Conchiglie*, **4** : 50-58.
- BARTON, N.H. et HEWITT, G.M. 1985.- Analysis of Hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16** : 113-148.
- BARTON, N.H. et HEWITT, G.M. 1989.- Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, **341** : 497-503.
- BAYNE, B.L. 1976.- *Marine mussels, their ecology and physiology*. Cambridge Univ. Press, 506 p.
- BLANC, F. et BONHOMME, F. 1987.- Polymorphisme génétique des populations naturelles de Mollusques d'intérêt aquicole. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux, 27-30 May 86, **1**: 59-78.
- BEAUMONT, A.R., BEVERIDGE, C.M. et BUDD, M.D. 1983.- Selection and heterozygosity within single families of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Mar. Biol. Lett.*, **4** : 151-161.
- BEAUMONT, A.R., SEED, R. et GARCIA-MARTINEZ, P. 1989.- Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. In : "*Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms*" J.S. Ryland et P.A. Tyler eds. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark. 251-258.
- BENZECRI, J.P. 1982.- *L'analyse des données : 2 . l'analyse des correspondances*. Durod, 40 édition : 632 pp.
- BERREBI, P. 1988.- *Génétique des populations marines : le modèle "Flet"*. Thèse d'Etat, U.S.T.L. Montpellier, 246 p.
- BISIGNANO, G., DI PIETRO, A., GRILLO, O.C. et PICERNO, I. 1980.- Serological studies on the genus *Mytilus*. Comparison of proteinic antigens extracted from *M. edulis* and *M. galloprovincialis*. *Revue Internationale d'Océanographie médicale*, **59** : 31-39.

- BOULETREAU, M. 1986.- The genetic and coevolutionary interaction between parasitoids and their hosts. In : "*Insect Parasitoids*", J. Waage and D. Greathead, eds. Acad. Press, London : 169-200.
- BORSA, P., ZAINURI, M. et DELAY, B. (ss presse)- Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity*.
- BRINKMANN, A.J. 1957.- Fish trematodes from Norwegian waters. Ila. The Norwegian species of the order Aspidogastrea and Digenea (Gasterostomata). *Universitetet i Bergen. Arbok.*, 4 : 29 pp.
- BUTMAN, C.A. 1987.- Larval settlement of soft sediment invertebrates : the spatial scales of patterns explained by active habitat selection and the emerging role of hydrodynamic processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 25 : 113-165.
- CAMERON R.A. 1986.- Introduction to the invertebrate larval biology workshop : a brief background. *Bull. Mar. Sci.*, 32 : 145-161.
- CHUBRIK, G.K. 1952.- On the life cycle of the fish trematode, *Prosorhynchus squamatus* Odhner, 1905 (Ru.). *Doklady Akademii Nauk*. 83 : 327-329.
- CHUBRIK, G.K. 1966.- Fauna and ecology of larval trematodes parasites in molluscs of Barents and white seas. Life cycle of parasitic worms of North seas" (Ru). *Trudy Akademii Nauk SSSR*, 10 : 78-158.
- CLAVERIA, F.G. et ETGES, F.J. 1987.- Differential susceptibility of male and female *Oncomelania hupensis quadrasi* infected with *Schistosoma japonicum*. *Int. J. for Parasitol.*, 17 : 1273-1277.
- CHENG, T.C. et SNYDER, R.W. 1962.- Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. I. A review. II. The utilization of the host's glycogen by the intramolluscan larvae of *Glythelmins pennsylvaniensis* Cheng and associated phenomena. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 81 : 209-228.
- CHENG, T.C. et COOPERMAN, J.S. 1964.- Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their host. V. The invasion of the reproductive system of *Helisona trivolvis* by the sporocysts and cercariae of *Glythelmins pennsylvaniensis* Cheng. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 83 : 12-23.
- CHENG, T.C., SULLIVAN, J.T. et HARRIS, K.R. 1973.- Parasitic castration of the marine prosobranch gastropod *Nassarius obsoletus* by sporocysts of *Zoogonus rubellus* (Trematoda) : histopathology. *J. invertebr. Pathol.*, 21 : 183-190.
- CHENG, T.C., SULLIVAN, J.T., HOWLAND, K.H., JONES, T.F. et MORAN, H.J. 1983.- Studies on parasitic castration : soft tissue and shell weights of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca) parasitized by larval trematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 42 : 143-150.
- COMBES, C. 1980.- Les mécanismes de recrutement chez les Métazoaires parasites et leur interprétation en termes de stratégies démographiques. *Vie Milieu*, 30 : 55-63.

- COMBES, C. 1988.- Les parasites et leurs cibles vivantes. In : "*L'adaptation*". Edition spéciale Pour la Science : 166-173.
- COMBES, C. 1990.- Concluding Remarks. In : *Pathology in Marine Science*. T.C. Cheng and F.O. Perkins eds., Academic Press.
- COUSTAU, C. 1987.- *Introduction à la biologie des trématodes parasites de Mytilus*. D.E.A. Parasitologie : écologie, pathologie, U.S.T.L., Montpellier, 30 p.
- COUSTAU, C., COMBES, C., MAILLARD, C., RENAUD F. et DELAY, B. 1990.- *Prosorhynchus squamatus* (Trematoda) parasitosis in the *Mytilus edulis* - *Mytilus galloprovincialis* complex : specificity and host-parasite relationships. In : *Pathology in Marine Science*, T.C. Cheng and F.O. Perkins eds., Academic Press : 291-298.
- COUSTAU, C., RENAUD, F., MAILLARD, C., PASTEUR, N., et DELAY B. (ss presse a) - Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of the *Mytilus edulis* / *galloprovincialis* complexe. *Genetical Research*..
- COUSTAU, C., RENAUD, F., DELAY, B., ROBBINS, I., et MATHIEU, M. (ss presse b) - Mechanisms involved in parasitic castration: *in vitro* effects of the trematode *Prosorhynchus squamatus* on the gametogenesis and the nutrient storage metabolism of the marine bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Experimental Parasitology*.
- DAGNELIE, P. 1973.- *Théorie et méthodes statistiques*. Presses agronomiques de Gembloux : 841 pp. (2 volumes).
- DE JONG-BRINK, M., ELSAADANY, M., BOER, H.H. et JOSSE, J. 1986. Influence of trematode parasites upon the reproductive activity of their intermediate hosts, freshwater snails. In : *Advance in Invertebrate Reproduction*, 4 : 163-172. M. Porchet, J.C. Andries and A. Dhainaut eds. Elsevier Science Publishers B.V.
- DE JONG-BRINK, M., HORDIJK, P.L., SCHALLIG, H., BERGAMIN-SASSEN, M. et OOSTHOEK, P. 1990.- Possible mechanisms underlying parasitic castration in trematode infected snails. In : *Advances in invertebrate reproduction*, 5, M. Hoshi & O. Yamashita eds., Elsevier Science Publishers.
- DE JONG-BRINK, M., ELSAADANY, M. et BOER, H.H. 1988. Shistosomin, an antagonist of calfluxin. *Exp.Parasitol.*, 65 : 109-118.
- DE JONG-BRINK, M. et BERGAMIN-SASSEN, M.J.M. 1989.- *Trichobilharzia ocellata* : influence on the interaction between the dorsal body hormone, a female gonadotropic hormone and the follicle cells in the gonad of the intermediate snail host *Lymnea stagnalis*. *Exp. Parasitol.*, 68 : 93-98.
- DIEHL, W.J. et KOEHN, R.K., 1985.- Multiple locus heterozygosity, mortality and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 88 : 265-271.
- DUBININA, M.N. 1964.- Cestodes of the family Ligulidae and their taxonomy. In : "*Parasitic worms and aquatic conditions*". Ergens et Rysavy eds., Czechoslovak Academy of Sciences, Prague : 175-188.

- EDWARDS, C.A et SKIBINSKI, D.O.F. 1987.- Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from south west England and south Wales. *Mar. Biol.*, **94** : 547-556.
- ESTUPINAN, B. et WAITE, J.H. 1988.- Induction of settlement and metamorphosis of *Mytilus edulis* (L.) larvae by dopa-containing polyphenolic protein. *J. Shellfish Res.*, **7** : 189-190.
- EUZEBY, J. 1984.- *Les parasitoses humaines d'origine animale*. Flammarion Médecine. Science, 324 p.
- EUZET, L. et COMBES, C. 1980.- Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. In : *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*. Mémoire n° 40 de la Société Zoologique de France. Tome III, Chapitre IV : 239-285.
- FENNER, F. et RATCLIFFE, F.N. 1966.- "*Myxomatosis*". Cambridge University Press. 132 p.
- FIELD, I.A., 1922.- Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Bull. U.S. Bureau Fish.*, **38** : 127-260.
- FOX, L.R. et MORROW, P.A. 1981.- Specialization : species property or local phenomenon ? *Science*, **211** : 887-893.
- FUTUYMA, D.J. et MORENO, G. 1988.- The evolution of ecological specialization. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19** : 207-233.
- GABBOTT, P.A. 1975.- Storage cycles in marine bivalve molluscs : a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In : *Proc. 9th. Eur. mar. Biol. Symp.* H. Barnes, ed., Aberdeen University press : 191-211.
- GAFFNEY, P.M. 1990.- Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis* : another look. *Evolution*, **44** : 204-210.
- GARDNER, J.P.A. et SKIBINSKI, D.O.F. 1988.- Historical and size-dependent genetic variation in hybrid mussel populations. *Heredity*, **61** : 93-105.
- GARTNER-KEPKAY, K.E., ZOUROS, E., DICKIE, L.M. et FREEMAN, K.R. 1983.- Genetic differentiation in the face of gene flow : a study of mussel populations from a single nova scotian embayment. *Can. J. Fish. quat. Sci.*, **40** : 443-451.
- GOSLING, E.M. 1984.- The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in western europe : a review. *Malacologia*, **25** : 551-568.
- GOSLING, E.M. 1989.- Genetic heterozygosity and growth rate in a cohort of *Mytilus edulis* from the Irish coast. *Marine Biology*, **100** : 211-215.
- GOSLING, E.M. et WILKINS, N.P. 1981.- Ecological genetics of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on Irish coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **4** : 221-227.

- GOSLING, E.M., WILKINS, N.P. 1985.- Genetics of settling cohorts of *Mytilus edulis* L. Preliminary observations. *Aquaculture*, **44** : 115-123.
- HAWKINS, A.J.S., BAYNE, B.L. et DAY, A.J. 1986.- Protein turnover, physiological energetics and heterozygosity in the bleue mussel, *Mytilus edulis* : the basis of variable age-specific growth. *Proc. R. Soc. Lond.*, **229** : 161-176.
- HELLUY, S. 1983.- Un mode de favorisation de la transmission parasitaire : la manipulation du comportement de l'hôte intermédiaire. *Rev. Ecol. (Terre vie)*, **38** : 211-223.
- HEWITT, G.M., 1988.- Hybrid zones - Natural laboratories for evolutionary studies. *Tree*, **3** : 158-167.
- HOLMES, J.C. 1983.- Evolutionary relationships between parasitic helminths and their hosts. In : "Coevolution", D.J. Futuyma & M. Slatkin eds., Sinauer Associated Inc., Sunderland, Massachusetts : 161-185.
- HORDIJK, P.L., EBBERINK, R.H.M., De JONG-BRINK, M. et JOOSSE, J. 1988.- Receptor-mediated inhibition of reproductive activity in a schistosome-infected freshwater snail. In : *Proceedings Spetsia Summerschool on Receptors, Membrane Transport and Signal Transduction*.
- JOHANNESSON, K., KAUTSKY, N. et TEDENGREEN, M. 1990.- Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. 2. Genetic variation. *Mar. Ecol. (Prog. ser.)*, **59** : 211-219.
- JOHNSTON, B.R., HALTON, D.W. et MOORE, M.N. 1982.- *Bucephaloïdes gracilescens* a quantitative study of the lysosomal cellular stress response induced by the sporocysts and developing cercariae within the white Yurrow shell, *Abra alba*. *Parasitenkunde*, **67** : 31-36.
- JOOSSE, J., Van ELK, R. 1983.- Intervention of a Trematode parasite in the action of the female gonadotrophic hormones on the albumen gland of *Lymnea stagnalis*. In : *Molluscan neuroendocrinology*, J. Lever, Boer H.H., Eds. Mon Roy. Nethh. Acad. of Arts and Sciences, Elsevier, Amsterdam : 118-120.
- JOOSSE, J., Van ELK, R., MOSSELMANS, WORTELBOER, H. et Van DIEPEN J.C.E. 1988.- Schistosomin : a pronase-sensitive agent in the hemolymph of *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnaea stagnalis* inhibits the activity of albumen gland *in vitro*. *Parasitol. Res.*, **74** : 228-234.
- JOURDANE, J. 1982.- Etude des mécanismes de rejet dans les couples mollusque-schistosome incompatible à partir d'infestations par voies naturelles et par transplantations microchirurgicales de stades parasitaires. *Acta Tropica*, **39** : 325-335.
- KOEHN, R.K., MILKMAN, R. et MITTON, J.B. 1976.- Population genetics of marine pelecypods : OV. Selection, migration and genetic differentiation in the Blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution*, **30** : 2-32.

- KOEHN, R.K. et SHUMWAY, S.E. 1982. A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the american oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar. biol. Lett.*, **3** : 35-42.
- KOEHN, R.K. et GAFFNEY, P.M. 1984.- Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar Biol.*, **82** : 1-7.
- KOEHN, R.K. et BAYNE, B.L. 1989.- Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biol. J. Limn. Soc.*, **37** : 157-171.
- LAUKNER, G. 1980.- Diseases of mollusca : Gastropoda. In : "*Diseases of Marine Animals*" , O. Kinne, ed., Wiley, New-York : 311-424.
- LE BRETON, J. 1979.- The sexuality of gastropod molluscs and parasitic trematodes. Contribution of the sex endocrinology of gastropods to the study and to the interpretation of parasite-induced changes. (1er Colloque International de Pathologie et Parasitologie des Mollusques, 1979, Perpignan), *Haliotis*, **8** : 215-241.
- LE BRUN, N. 1988.- *Spécificité des relations hôtes-parasites : le modèle Cyprinidae-Diplozoon*. Thèse de Doctorat, U.S.T.L., Montpellier : 168 p.
- LEBOUR, M.V., 1908.- Fish trematodos of the northumberland coast. *Northumberland Sea Fish Report*, 1907 : 3-47.
- LENOIR, F. et MATHIEU, M. 1986.- Utilisation de cultures dissociées dans l'étude des contrôles exercés sur la gamétogenèse chez la Moule *Mytilus edulis* L. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. **303**, série III, n° 12: 523-528.
- LENOIR, F., ROBBINS, I., MATHIEU, M., LUBET, P. et GABBOTT, P.A. 1989.- Isolation, characterization and glucose metabolism of glycogen cells (= vesicular connective-tissue cells) from the labial palps of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **101** : 495-501.
- LEVINSEN, G.M.R. 1881.- Bidrag til kunskaab om Gronlands Trematodenfauna. *Overs. K. Danske Vidensk. Selsk. Forth.*, **1** : 52-84.
- LEWIS, J.R. et SEED, R. 1969.- Morphological variations in *Mytilus* from south-west England in relation to the occurrence of *M. galloprovincialis* (Lmk). *Cahier de Biologie Marine*, **10** : 231-253.
- LUBET, P., 1973.- Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamark, 1818). *Synopsis FAO sur les pêches*, N° 88, FAO Rome. 43 p.
- LUBET, P. 1976.- Ecophysiologie de la reproduction chez les Mollusques Lamellibranches. *Haliotis*, **7** : 49-55.
- LUBET, P. 1981.- Action de la température sur le cycle de reproduction des Lamellibranches. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **106** : 283.

- LUBET, P., GIMAZANE, J.P. et PRUNUS, G. 1981.- Etude du cycle de reproduction de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) à la limite méridionale de son aire de répartition. Comparaison avec les autres secteurs de cette aire. *Haliotis*, **11** : 157-170.
- LUBET, P., PRUNUS, G., MASSON, M. et BUCAILLE, D. 1984.- Recherches expérimentales sur l'hybridation de *Mytilus edulis* L. et *M. galloprovincialis* Lmk (Mollusques, Lamellibranches). *Bull. Soc. Zool. Fr.* : 87-89.
- LUBET, P. et MATHIEU, M. 1982.- The action of internal factors on gametogenesis in pelecypod molluscs. *Proc. Seventh International Malacological Congress Malacologia*, **22** : 131-136.
- LUBET, P. et STREIFF, W. 1982.- Contrôle neuroendocrine de la reproduction chez les Mollusques. *J. Physiol. Paris*, **78** : 537-542.
- LUBET, P., ALOUI, N. et KARNAUKHOVA, N. 1986.- Etude expérimentale de l'action de la température sur le cycle de reproduction de *M. galloprovincialis* Lmk, comparaison avec *M. edulis* L. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. **303**, sér. III, n°12 : 507-512.
- Mc SHANE, P.E., BLACK, K.P. et SMITH, M.G. 1988.- Recruitment processes in *Haliotis rubra* (Mollusca : Gastropoda) and regional hydrodynamics in southeastern Australia imply localised dispersal of larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **124** (3) : 175-203.
- MALEK, E.A. et CHENG, T.C., 1974.- *Medical and Economical Malacology*. Academic Press, New York and London : 398 p.
- MALLET, A.L. et HALEY, L.E., 1984.- General and specific combining abilities of larval and juvenile growth and viability estimated from natural oyster populations. *Mar. Biol.*, **87** : 165-172.
- MALLET, A.L., ZOUROS, E., GARTNER-KEPKAY, K.E., FREEMAN, K.R. et DICKIE, L.M. 1985.- Larval viability and heterozygote deficiency in populations of marine bivalves : evidence of pair matings of mussels. *Marine Biology*, **87** : 165-172.
- MANTER, H.M. 1966.- Parasites of fishes as biological indicators of recent and ancient conditions. In : "*Host-parasite relationships*". Mc. Cowley, ed. Oregon State University Press, Grallis : 59-71.
- MATHIEU, E. 1990.- *Structures génotypiques multidimensionnelles : simulations, modélisations, analyses*. Thèse de Doctorat, U.S.T.L., Montpellier : 72 pp.
- MATHIEU, M., BERGERON, J.P. et ALAYSE DAVET, A.M. 1982.- L'aspartate transcarbamylase, indice d'activité gametogénétique chez la moule *Mytilus edulis* L. *Int. Jour. of Invertebrate Reproduction*, **5** : 337-343.
- MATHIEU, M., LENOIR, F. et ROBBINS, I. 1988.- A gonial mitosis-stimulating factor in cerebral ganglia and hemolymph of the marine mussel *Mytilus edulis* L. *General and Comparative endocrinology*, **72** : 257-263.

- MATTHEWS, R.A. 1972.- The life-cycle of *Proisorhynchus crucibulum* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1905 and comparison of its cercaria with that of *Proisorhynchus squamatus* Odhner, 1905. *Parasitology*, **66** : 133-164.
- MAY, R.M. et ANDERSON, R.M. 1983.- Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc. Roy. Soc. London*, **B 219** : 281-313.
- MAYNARD SMITH, J. et PRICE G.R. 1973.- The logic of animal conflict. *Nature*, **246** : 15-18.
- MAYNARD SMITH, J. 1974.- The theory of games and the evolution of animal conflicts. *Journal of theoretical Biology*, **47** : 209-221.
- MAYNARD SMITH, J. 1982.- *Evolution and the theory of games*. Cambridge University Press.
- MICHELSON, E.H. et DUBOIS. 1981.- An isoenzyme marker possibly associated with the susceptibility of *Biomphalaria glabrata* populations to *Schistosoma mansoni*. *Acta tropica*, **38** : 419-426.
- MORSE, A.N.C. et MORSE, D.E. 1984.- Recruitment and metamorphosis of *Haliotis larvae* induced by molecules uniquely available at the surface of crustose red algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **75** : 191-215.
- MOULIA, C., AUSSEL, J.P., BONHOMME, F., BOURSOT, P., NIELSEN, J.T. et RENAUD, F. (in press).- Wormy mice in a hybrid zone : a genetic control of susceptibility to parasite infection. *Journal of Evolutionary Biology*.
- MULVEY, M. et WOODRUFF, D.S. 1985.- Genetics of *Biomphalaria blabrata* : linkage analysis of genes for pigmentation, enzymes and resistances to *Schistosoma mansoni*. *Biochemical genetics*, **22**, n° 11/12 : 877-889.
- NEWELL, R.I.E., HILBISH, T.J., KOEHN, R.K. et NEWELL, C.J. 1982.- Temporal variation in the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. (Bivalvia, Mytilidae) from localities on the east coast of the United States. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, **162** : 299-310.
- NICOLL, W. 1914.- The trematodes parasites of fishes from the english channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **10**: 466-505.
- ODHNER, T. 1905.- Die Trematoden des arktischen Gebietes. *Fauna arctica*, **4** : 291-372.
- PARLEVLIET, J.E. 1986.- Coevolution of host resistance and pathogen virulence : possible implications for taxonomy. In : "*Coevolution and Systematics*", A.R. Stone & D.L.eds., Hawksworth, Clarendon Press, Oxford.: 19-34.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, G., CATALAN, J. et BRITTON-DAVIDIAN J. 1987.- *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Lavoisier ed., Technique et Documentation, Paris : 232 p.

- PEARSON, E.J. et CHENG, T.C., 1985.- Studies on parasitic castration : occurrence of a gametogenesis)inhibiting factor in extract of *Zoogonus lasius* (Trematoda). *Journal of Invertebrate Pathology*, **46** : 239-346.
- PHILIPS, H.J. 1973.- Dye exclusion tests for all viability. In : "*Tissue and culture*" P.F. Kruse ed., Academic Press, New York : 407-408.
- PRICE, P.W. 1980.- *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton University Press : 237.
- RENAUD, F. et DE MEEUS, T. (sous presse). - A simple model of host-parasite evolutionary relationships. Parasitism : Compromise or conflict ? *Journal of theoretical Biology*.
- RICHARDS, C.S. 1975.- Genetic factors in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for different stains fo *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **70** : 231-241.
- RICHARDSON, B.J., BAVERSTOCK, P.R. et ADAMS, M. 1986.- *Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies*. Academic Press : 410 p.
- ROBBINS, I., LENOIR, F. et MATHIEU, M. 1990. A putative neuroendocrine factor that stimulates glycogen mobilization in isolated glycogen cells from the marine mussel *Mytilus edulis*. *General and comparative endocrinology*, **79**, 123-129.
- ROBBINS, I., LENOIR, F. et MATHIEU, M. (ss presse) - Neuroendocrine factors affecting the glycogen metabolism of purified *Mytilus edulis* glycogen cells. Partial characterization of the putative glycogene mobilization hormone. *General and comparative endocrinology* .
- RODHOUSE, P.J., Mc DONALD, J.H., NEWELL, R.I.E. et KOEHN, R.K. 1986.- Gamete production, somatic growth and multiple locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol.*, **90** : 209-214.
- ROUX, M. 1985.- *Algorithmes de classification*. Masson : 151 p.
- SAGE, R.D., HEYNEMAN, D., LIM, K.C. et WILSON, A.C. 1986.- Wormy mice in a hybrid zone. *Nature*, **324** : 60-63.
- SCHERRER, B. 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin ed., Québec, Canade : 850 p.
- SCOTT, T.M. et KOEHN, R.K. 1990.- The effect of environmental stress on the relationship of heterozygosity to growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **135** : 109-116.
- SEED, R. 1968.- Factors influencing shell shape in the mussel *Mytilus edulis*. *J. mar. biol. Ass. Uk.* **48** : 561-584.
- SEED, R. 1971.- A physiological and biochemical approach to the taxonomy of *M. edulis* L. and *M. galloprovincialis* Lmk from S.W. England. *Cahier de Biologie marine*, **12** : 291-322.

- SEED, R. 1972.- Morphological variation in *Mytilus* from the French coasts in relation to the occurrence and distribution of *M. galloprovincialis*. *Cahiers de Biologie marine*, **13** : 357-384.
- SEKI, T. et KAN-NO H. 1981.- Induced settlement of the Japanese abalone, *Haliotis discus hannai*, veliger by the mucous trails of the juvenile and adult abalones. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **42** : 31-39.
- SELANDER, R.K. 1970.- Behavior and genetic variation in natural populations. *Am. Zool.*, **10** : 53-66.
- SHE, J.X., AUTEM, M., KOTULAS, G., PASTEUR, N. et BONHOMME, F. 1987.- Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **32** : 357-371.
- SKIBINSKI, D.O.F. 1983.- *Natural selection in hybrid mussel populations*. Systematics Association Special Volume n° 24, "Protein polymorphism : Adaptive and taxonomic significance, Academic Press : 283-297.
- SKIBINSKI, D.O.F., AHMAD, M. et BEARDMORE, J.A. 1978.- Genetic evidence for naturally occurring hybrids between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Evolution*, **32** : 354-364.
- SKIBINSKI, D.O.F. et BEARDMORE, J.A. 1979.- A genetic study of intergradation between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Experientia*, **35** : 1442-1444.
- SKIBINSKI, D.O.F., CROSS, T.F. et AHMAD, M. 1980.- Electrophoretic investigation of systematic relationships in the marine mussels *Modiolus modiolus* L., *Mytilus edulis* L. and *Mytilus galloprovincialis* Lmk (Mytilidae ; Mollusca). *Biol. Journ. of the Linnean Society*, **13** : 65-73.
- SKIBINSKI, D.O.F., BEARDMORE, J.A. et CROSS, T.F. 1983.- Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae ; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, **19** : 137-183.
- SOKAL, R.R. et ROHLF, F.J. 1969.- *Biometry*. Freeman and Co. Eds., San Francisco. 776 p.
- SULLIVAN, J.T., CHENG, T.C. et HOWLAND, K.H. 1985.- Studies on parasitic castration : castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca : Gastropoda) by several marine trematodes. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, **104** : 154-171.
- SUTHERLAND, W.J. 1987.- Why do animals specialize ? *Nature*, **325** : 483-484.
- TAKAHASHI, F. et PIMENTEL, D. 1967.- Wasp preference for black brown and hybrid-type pupae of the house fly. *Annals of the Entomological Society of America*, **60** : 623-625.
- THIRIOT-QUIEVREUX, C. 1984.- Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia : Mytilidae). *Mar. Biol. Lett.*, **5** : 265-273.

- THOMPSON, J.N. 1986.- Patterns in Coevolution. In : "*Coevolution and Systematics*". A.R. Stone & D.L. Hawksworth Clarenton Press, Oxford.
- TOULLEC, J.Y., LENOIR, F., Van VORMHOUDT, A. et MATHIEU, M. 1988.- Non species growth factor from cerebral ganglia of *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **119** : 111-117.
- TOULLEC, J.Y., LENOIR, F., Van WORMHOUT, A. et MATHIEU, M. 1989.- Approche expérimentale du contrôle de la croissance chez les bivalves. *Oceanis*, **15** : 511-517.
- Van der KNAAP, W.P.W. et LOKER, E.S. 1990.- Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today*, **6** : 175 p.
- VARVIO, S.L., KOEHN, R.K., VAINÖLÄ K. 1988.- Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region. *Mar. Biol.* **98** : 51-60.
- WALLET, M. 1984.- *La Bucéphalose larvaire à Bucephalus polymorphus Baer, 1827 (Trematoda ; Digenea)*. Thèse de 3ème cycle, Université Montpellier II : 188 pp.
- WHITHAM, T.G. 1989.- Plant hybrid zones as sinks for pests. *Science*, **244** : 1490-1493.
- WRIGHT, C.A. 1966.- The pathogenesis of Helminths in the mollusca. *Helminthological abstracts*, **35** : 207-224.
- XIA M. 1990.- *Contribution à l'étude du développement et de la variabilité génétique de Schistosoma japonicum*. Thèse de Doctorat, Université de Perpignan .
- YAMAGUTI, S. 1971.- *Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates*. Keikagu Publisher, Tokyo.
- ZOUROS, E., SINGH, S.M. et MILES, H.E. 1980.- Growth rate in oysters : an overdominant phenotype and its possible explanation. *Evolution*, **34** : 856-867.
- ZOUROS, E. et FOLTZ, D.W. 1984.- Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth and for the deficiency of heterozygots, in oyster populations. *Dev. Genet.* **4** : 393-405.
- ZOUROS, E. et FOLTZ, D.W. 1987.- The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. In : *Isosymes : current topics in biological and medical research*. M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios and G.S. Whitt, eds., New york : A.R. Liss Inc : 1-59.
- ZOUROS, E., ROMERO-DOREY, M. et MALLETT, A.L. 1988.- Heterozygosity and growth in marine bivalves : further data and possible explanations. *Evolution*, **42** : 1332-1341.

ANNEXES

ANNEXE I

ELECTROPHORESE DES PROTEINES ENZYMATIQUES

L'électrophorèse permet de séparer, sous l'action d'un champ électrique, des particules chargées en solution.

Cette technique, largement utilisée, est décrite et analysée en détail par Richardson *et al.* (1986) et Pasteur *et al.* (1987).

Nous avons employé la méthode d'électrophorèse sur gel d'amidon décrite par Pasteur *et al.* (1987), dans le but d'analyser le polymorphisme des protéines enzymatiques.

Brièvement, il s'agit de déposer une série d'extraits sur le gel d'amidon, puis d'appliquer un courant électrique. La migration des protéines dépend de leur charge électrique dans le tampon utilisé. Lorsque les protéines enzymatiques ont suffisamment migré, leur position est visualisée grâce à une révélation spécifique (procédé histochimique permettant soit de colorer les produits de dénaturation de l'enzyme considérée ou un corps chimique qui lui est associé, soit d'obtenir un précipité coloré en utilisant les propriétés catalytiques de l'enzyme).

Sauf cas particuliers (Pasteur *et al.* 1987), chaque bande, ou niveau de migration peut correspondre:

- aux produits de l'expression de plusieurs gènes situés sur autant de locus,
- aux produits de l'expression de plusieurs allèles du même gène à un seul locus.

Le polymorphisme phénotypique (que nous caractérisons sur le gel) reflète donc directement le polymorphisme génotypique.

Les différentes combinaisons "révélation enzymatique / tampon" que nous avons testées sont consignées dans le tableau I. Seuls les systèmes Estérase D (EST D; EC 3111), Leucine-Amino-Peptidase (LAP), Phospho-Glucose-Isomérase (PGI; EC 5319), Octopine-Déshydrogénase (ODH), et Mannose-Phosphate-Isomérase (MPI EC 5318) se sont révélés, à la fois, interprétables, polymorphes, et discriminants entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis*. Les deux autres systèmes polymorphes Isocitrate-Déshydrogénase (IDH; EC 11142) et Phosphoglucomutase (PGM; EC 2751) ont également été utilisés pour caractériser les individus d'un échantillon de *M. edulis*.

Les combinaisons utilisées sont:

Tableau I: Révélations enzymatiques testées après migration dans différents tampons (les abréviations utilisées sont celles de Pasteur *et al.* 1987). - : aucune activité; + : faible activité; ++ : activité moyenne; +++ : bonne activité.
M : système monomorphe; P : système polymorphe.

	PC 6.3	TBE 8.6	TC 6.7	TC 8.0	TME 7.4	TCE 9.4	TCBL 8.0
ACO			-	-			
ACP			-			-	
ADA			+				
AK		-	+	+	-		
AKP			-			-	
CK				++	-		-
DIA							
EST D	+++ P		+	+			
FK			++		+		-
FUM			-				
HPD	-		-				
GLD			-				
G6PD			++			-	
HBDH		-				-	-
HK		++ M			++ M		
IDH	+++ M		+++ P	+++ P	+		
LAP	+++ P	++		+	++	+	
ME		++	++	+			
MDH		+	+++ M	++		++	
MPI				+++ P			
NP		-			-		
ODH				+++ P		+	
6PGD		++	++				
PGI	+++ P			+++ P			
PGM		-	+++ P	++			
PK	++			++			-
SDH	+	++		+++ M			
XDH			-				

Locus	Tampon	Extraits
EST D	PC 6,3	Glande digestive
LAP	PC 6,3	Glande digestive
PGI	PC 6,3	Glande digestive
ODH	TC 8,0	Muscle
MPI	TC 8,0	Muscle
IDH	TC 8,0	Muscle
PGM	TC 6,7	Muscle

Les recettes des solutions tampon et de révélation ont été inspirées de Pasteur *et al.* (1987) puis adaptées à notre matériel.

COMPOSITION DES SOLUTIONS TAMPON:

PC 6,3: Phosphate-Citrate pH 6,3

Tampon d'électrodes:

citrate trisodique (0,15 M).....44,1 g
phosphate monosodique (0,24 M)...37,4 g
eau distillée.....1000 ml
-> ajustement pH 6,3

Tampon de gel:

tampon d'électrode.....10 ml
eau distillée.....390 ml
+ 45 g d'amidon

TC 8,0: Tris-citrate pH 8,0

Tampon d'électrodes:

tris.....75,6 g
acide citrique monohydraté.....30 g
eau distillée.....1000 ml
-> ajustement pH 8,0

Tampon de gel:

tampon d'électrode.....16 ml
eau distillée.....384 ml
+ 45 g d'amidon

TC 6,7: Tris-Citrate pH 6,7

Tampon d'électrodes:

tris (0,22 M).....27 g
acide citrique monohydraté.....18 g
eau distillée.....1000 ml
-> ajustement pH 6,7

Tampon de gel:

tris (0,22 M).....390 mg
acide citrique monohydraté.....255 Mg
eau distillée.....400 ml
-> ajustement pH 6,7
+ 45 g d'amidon

COMPOSITION DES SOLUTIONS DE REVELATION:

*** EST D:**

Avant emploi:

4 MU acétate.....5 mg
diluer dans qq gouttes d'eau
tampon acétate A.....50 ml

*** LAP:**

L leucyl B naphthyl amide.....60 mg

diluer dans qq gouttes d'eau

tris C.....40 ml

MgCl₂ 0,5 M.....5 ml

Avant emploi:

black K salt.....20 mg

incuber à 30 °C environs

*** PGI:**

tris A.....15 ml

MgCl₂ 0,1 M.....1 ml

NADP.1 %.....0,5 ml

NAD 1 %.....1 ml

NBT 1 %.....1 ml

fructose 6 phosphate.....10 mg

Avant emploi:

G6PDH.(56 unités).....20 µl

PMS 1 %.....0,5 ml

agarose 2 %.....5 ml

*** ODH:**

tris A.....12 ml

octopine.....5 mg

MgCl₂ 0,5 M.....2 ml

NAD 1 %.....1 ml

Avant emploi:

MTT 1 %.....1 ml

PMS 1 %.....1 ml

agarose 2 %.....5 ml

*** MPI:**

tris A.....10 ml
mannose 6P.....20 mg
NAD 1 %.....1 ml
NADP 1 %.....0,5 ml
pyruvate.....20 mg

Avant emploi:

GPI (25 unités).....15 µl
G6PDH (17 unités).....5 µl
MTT 1 %.....1 ml
PMS 1 %.....1 à 2 gouttes
agarose 2 %.....5 ml

*** IDH:**

tris A.....12 ml
acide isocitrique.....100 mg
MgCl₂ 0,25 M.....0,5 ml
NADP 1 %.....1 ml
NBT 1 %.....1 ml

Avant emploi:

MTT 1 %.....1 ml
PMS 1 %.....0,5 ml
agarose 2 %.....5 ml

*** PGM:**

tris A.....15 ml
MgCl₂ 0,1 M.....1 ml
NADP.1 %.....0,5 ml
NAD 1 %.....1 ml
NBT 1 %.....1 ml
glucose 1 phosphate.....300 mg

Avant emploi:

MTT 1 %.....1 ml
G6PDH.(56 unités).....20 ul

PMS 1 %.....0,5 ml
agarose 2 %.....5 ml

Les solutions tampon pour révélation (tris A et acétate A) sont celles décrites par Pasteur *et al.* (1987).

ANNEXE II

**DEBUT DE CARACTERISATION DE LA PERIODE
D'INFESTATION
DE *P. SQUAMATUS***

P. squamatus a un cycle de développement annuel chez l'hôte mollusque. A Groix (cf "Présentation du matériel"), les prévalences atteignent des valeurs maximales au cours des mois de Mai-Juin-Juillet, et sont nulles en automne et au début de l'hiver.

Afin de mieux connaître la période d'infestation, nous avons réalisé l'expérimentation suivante:

- Des individus de type morphologique *M. edulis* ont été prélevés à Groix en Aout, Octobre, Décembre 1987, et Janvier, Mars 1988. Les prévalences observées sont indiquées sur la figure 1.

- Des échantillons prélevés au cours de ces mêmes mois ont été installés séparément dans des bassins, à la station IFREMER de La Trinité/Mer. Tous les lots ont été disséqués en Mars 1988. Les mortalités ont été estimées par comptage des coquilles vides dans les bassins. Les prévalences de *P. squamatus* au sein de chaque lot (Fig. 2) sont très différentes de celles observées en milieu naturel au moment des prélèvements (Fig. 1).

Ces résultats montrent, par exemple, que 31 % des individus prélevés en Décembre étaient déjà infestés alors qu'aucun d'entre eux ne présentait de sporocyste développé au moment du prélèvement.

Dans ce site, l'infestation semble se produire dès le mois d'Aout, alors que les sporocystes n'apparaissent dans le tissu hôte qu'à partir du mois de Janvier.



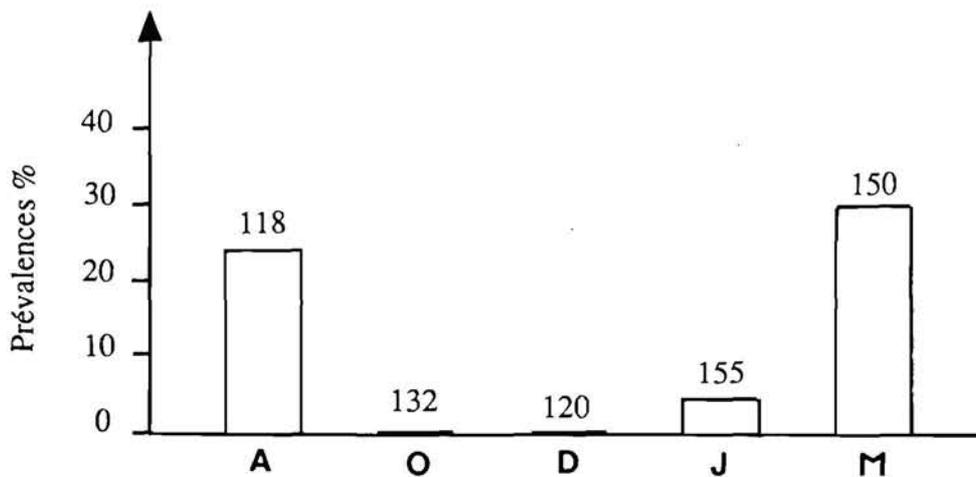


Figure 1: Prévalences de *P. squamatus* au sein d'échantillons de *M. edulis* prélevés à Groix en Aout (A), Octobre (O), Décembre (D), Janvier (J), et Mars (M). Les numéros correspondent au nombres d'individus examinés dans chaque lot.

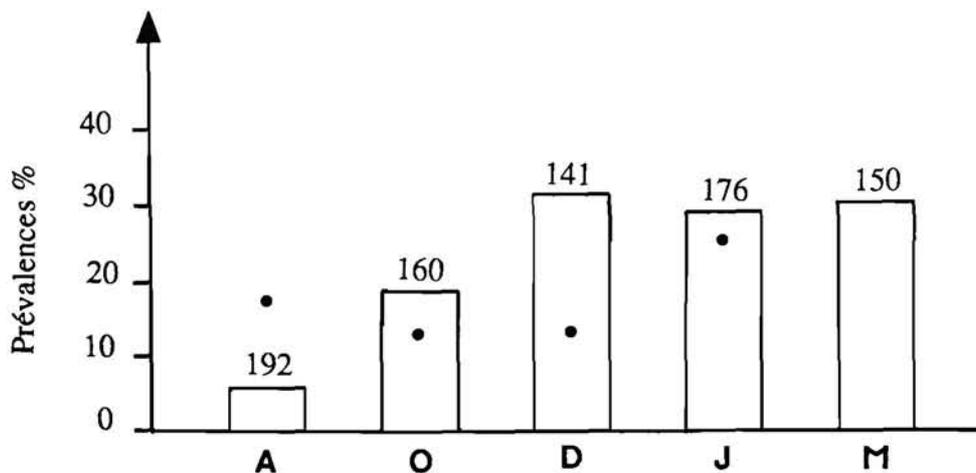


Figure 2: Prévalences de *P. squamatus* au sein d'échantillons de *M. edulis* prélevés à Groix en Aout (A), Octobre (O), Décembre (D), Janvier (J), et Mars (M), puis mis en bassin et disséqués en Mars. Les numéros correspondent au nombres d'individus examinés dans chaque lot. Les mortalités (%) sont indiquées par les points noirs.